



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

“ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, ANTIFÚNGICA Y FITOTÓXICA DE HONGOS ENDÓFITOS DE
Gliricidia sepium (FABACEAE): IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES
Y NO VOLÁTILES DE *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. ROSA ELVIRA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ

TUTORA: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

INSTITUTO DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ANA LUISA ANAYA LANG, INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA, INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., ENERO DEL 2016

Jurado asignado

Presidente: Dra. Irma Romero Álvarez
Secretario Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal: Dra. Concepción Toriello Nájera
Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Tutora:

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Sustentante:

Q.F.B. Rosa Elvira Sánchez Fernández

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la Beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado (agosto del 2010 a julio del 2015), y por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través del proyecto 179194.

Al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Unidad de Administración del Posgrado (UAP) de la UNAM por el apoyo otorgado.

A mi asesora, la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por haberme guiado en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, gran apoyo, amistad y comprensión.

A los integrantes del comité tutor, la Dra. Ana Luisa Anaya Lang y el Dr. Manuel Jiménez Estrada, por los comentarios, sugerencias y apoyo cada semestre que ayudaron a mejorar el trabajo.

A los miembros del jurado, cuyos comentarios y observaciones mejoraron notablemente este trabajo.

A la M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM, por sus enseñanzas, gran apoyo y colaboración en el análisis por CG-EM.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su apoyo con la identificación molecular de los hongos en estudio y por su apoyo en la corrección del artículo.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras del Instituto de Biología, UNAM, por su ayuda en la identificación taxonómica morfológica y molecular de los hongos endófitos.

Al M. en C. Daniel Díaz Espinosa de los Monteros, por su valiosa ayuda con el análisis estadístico que ayudó a mejorar considerablemente el trabajo.

Al M. en C. Allan Espinosa Gómez y a la M. en B. Beatriz Ruíz Villafán del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su apoyo en la identificación molecular de los hongos endófitos.

Al M. en C. Rafael Ibarra, por su valiosa colaboración en la revisión del manuscrito y sus comentarios.

Al M. en C. Baldomero Esquivel del Instituto de Química, UNAM, por su gran apoyo para realizar este proyecto, sin él no se hubiera realizado este proyecto de la mejor manera.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por su apoyo con la campana de flujo laminar y algunos estándares de compuestos orgánicos volátiles.

A la Dra. Laura Guzmán del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su apoyo y amistad.

A la Q.A. Blanca Estela Hernández Bautista, por su gran apoyo al principio del proyecto y su amistad.

A la QFB Mónica Flores Reséndiz del Instituto de Química, UNAM, por su trabajo que ayudó a complementar este proyecto de tesis y por su amistad. Algunos resultados presentados en esta tesis son parte de los resultados obtenidos en la tesis de licenciatura de Mónica Flores, de la cual fui supervisora técnica.

Al M. en C. Ernesto Ladrón de Guevara Reyes de la Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo incondicional durante mis estudios de posgrado, su valiosa ayuda y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba por su valiosa colaboración.

A los técnicos académicos del Instituto de Química, UNAM: M. en C. Héctor Ríos Olivarez, la Dra. Beatriz Quiroz García, Dra. Isabel Chávez, M. en C. Elizabeth Huerta, Q. María de los Angeles Peña, Ing. Q. Luis Velasco-Ibarra, Dr. Francisco Javier Pérez Flores, Q.F.B. Rocío Patiño y M. en C. Simón Hernández Ortega, por la realización de los experimentos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X.

A las Dras. Bertha Tlapal Bolaños y Olga Gómez del Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, por la donación de los fitopatógenos.

A la M. en C. Rebeca Martínez del Instituto de Biología, UNAM, por su ayuda con las microfotografías de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a.

Índice

Lista de figuras	5
Lista de cuadros	9
Lista de gráficas	13
Lista de abreviaturas	15
Resumen	17
Abstract.....	19
I. Introducción.....	21
II. Antecedentes.....	23
1. Definición de hongo endófito	23
2. Clasificación de los hongos endófitos	23
3. Relaciones que se establecen entre los hongos endófitos y sus hospederas	25
4. Metabolitos secundarios de hongos endófitos	26
5. Mecanismos de protección de los hongos endófitos a sus plantas hospederas.....	28
6. Interacciones interespecíficas entre hongos	30
6.1. Producción de metabolitos secundarios en cocultivos	34
7. Metabolitos secundarios de hongos endófitos con potencial para su uso en la agricultura.....	35
8. El género <i>Nodulisporium</i>	38
8.1. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Nodulisporium</i> y su actividad biológica.....	39
9. Criterios para la selección de plantas hospederas	42
10. Sitio de recolecta de plantas	42
III. Hipótesis	45
IV. Objetivos	47
1. Objetivos Generales	47
2. Objetivos particulares	47
V. Materiales y Métodos	51
1. Recolecta del material vegetal.....	51
2. Aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos de hojas de plantas de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH).....	51
2.1. Aislamiento de hongos endófitos	51

2.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos.....	55
2.3. Purificación y conservación de hongos endófitos y fitopatógenos	55
3. Determinación de la tasa de crecimiento, características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Gliricidia sepium</i>	55
4. Bioensayos de antagonismo directo.....	56
4.1. Antagonismos directos simples entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos aislados de <i>G. sepium</i>	56
4.2. Antagonismos directos simples entre hongos endófitos y microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola	59
4.3. Antagonismos entre el endófito antagonico <i>Nodulisporium</i> sp. aislamiento GS4d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola	59
4.3.1. Antagonismo directo simple	59
4.3.2. Antagonismo directo múltiple	60
5. Identificación de los hongos endófitos más antagonicos	61
6. Cultivo en pequeña escala de hongos endófitos	63
6.1. Cultivos en pequeña escala de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a en interacción con <i>Pythium aphanidermatum</i>	64
7. Obtención de extractos orgánicos	64
7.1. Obtención de extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a en interacción con <i>P. aphanidermatum</i>	65
8. Evaluación del potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico	66
8.1. Evaluación de la actividad antifúngica y antioomiceto.....	66
8.2. Evaluación de la actividad fitotóxica	67
8.3. Evaluación de la actividad antifúngica y fitotóxica de compuestos volátiles de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	68
9. Cultivo en mediana escala.....	69
9.1. Cultivo en CPD	69
9.2. Cultivo en medio arroz	69
10. Estudio químico	70
10.1. Métodos cromatográficos generales	70
10.2. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto del medio de cultivo en mediana escala de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	70
10.3. Aislamiento, purificación e identificación de las isobenzofuranonas 28-31 de la fracción primaria 4.....	72

10.3.1. Obtención de la 7-Hidroxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (28), 7-metoxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (29), 6-formil-4-metil-7-metoxi-3H-isobenzofuran-1-ona (30) y 7-metoxi-6-metil-3H-isobenzofuran-1-ona (31).....	72
10.4. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 28-31	74
11. Identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)	74
11.1. Identificación de VOCs de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.....	74
11.2. Identificación de los componentes volátiles presentes en el extracto del medio de cultivo, micelio y fracciones primarias no polares de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.....	77
VI. Resultados y Discusión.....	79
1. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de hojas de plantas de la REBIOSH	79
2. Determinación de la tasa de crecimiento, características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de <i>G. sepium</i>	81
3. Bioensayos de antagonismos entre hongos endófitos y entre endófitos y fitopatógenos aislados de <i>G. sepium</i>	99
3.1. Antagonismos entre hongos del Grupo I	100
3.2. Antagonismos entre hongos del Grupo II.....	100
3.3. Antagonismos entre hongos del Grupo III.....	101
3.4. Antagonismos entre hongos del Grupo IV.....	102
3.5. Antagonismos entre hongos del Grupo V.....	102
3.6. Antagonismos entre hongos del Grupo VI.....	103
3.7. Antagonismos entre hongos del Grupo VII.....	103
3.8. Antagonismos entre los hongos endófitos más competitivos.....	105
3.9. Antagonismos entre los hongos endófitos más competitivos y fitopatógenos aislados de <i>G. sepium</i>	107
3.10. Antagonismos entre los hongos endófitos más competitivos y hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia agrícola.....	108
3.11. Bioensayos de antagonismo directo entre <i>Nodulisporium</i> sp. GS42d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.....	110
3.12. Bioensayos de antagonismo múltiple directo entre <i>Nodulisporium</i> sp. GS42d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.....	114
4. Evaluación de la actividad antifúngica y fitotóxica de compuestos volátiles de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	117
5. Cultivo en pequeña escala de hongos endófitos de <i>G. sepium</i>	118
6. Evaluación del potencial antifúngico y fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala	121

7. Identificación molecular de algunos de los hongos endófitos más competitivos	131
8. Identificación del hongo endófito <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a (GSE27)	132
9. Cultivo a mediana escala	134
10. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo del medio de cultivo en mediana escala de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	137
10.1. Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en la fracción primaria activa 4	137
10.2. Caracterización de los metabolitos secundarios presentes en la fracción activa 4	138
11. Determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de las isobenzofuranonas aisladas.....	147
12. Cultivos en medios PDA y MA de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a en interacción con <i>P. aphanidermatum</i>	150
13. Identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.....	154
13.1. Identificación de los metabolitos volátiles en la fase de vapor (HS-SPME): similitudes y diferencias entre tratamientos	155
13.1.1. Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA) de los perfiles de VOCs	163
13.1.2. VOCs en los tratamientos Nod3 y Nod5	166
13.1.3. VOCs en interacción antagónica intraespecífica Nod-Nod	167
13.1.4. VOCs en interacción antagónica interespecífica Nod-Pyt.....	167
13.1.5. Función Ecológica y la actividad biológica de los VOCs identificados	170
13.2. Identificación de los componentes volátiles y semivolátiles del medio de cultivo y micelio y de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	172
VII. Conclusiones.....	175
VIII. Perspectivas	179
IX. Referencias bibliográficas	181
X. Anexo I. Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos.....	193

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Hipótesis del Antagonismo Balanceado.	25
Figura 2	Bioensayo de antagonismo en caja de Petri entre dos hongos (A y B). a y b representan los radios de cada microorganismo.	58
Figura 3	Esquema del bioensayo de antagonismo directo múltiple entre <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a y los microorganismos fitopatógenos: 1) <i>Phytophthora palmivora</i> , 2) <i>Pythium aphanidermatum</i> , 3) <i>Alternaria solani</i> , 4) <i>Phytophthora parasitica</i> , 5) <i>Fusarium oxysporum</i> , 6) <i>Pythium ultimum</i> , 7) <i>Phytophthora capsici</i> , 8) <i>Pythium polytylum</i> y 9) <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	61
Figura 4	Selección de interacciones antagónicas entre endófitos aislados de <i>Gliricidia sepium</i> . GSE18 y GSE22: <i>Xylaria</i> sp., GSE11: <i>Fusarium</i> sp., GSE9, GSE10 y GSE13: <i>Nodulisporium</i> sp., GSE27: <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	107
Figura 5	Selección de interacciones antagónicas entre los hongos endófitos más competitivos y los fitopatógenos aislados ambos de <i>Gliricidia sepium</i> . GSE18 y GSE21: <i>Xylaria</i> sp., GSE10 y GSE13: <i>Nodulisporium</i> sp., GSE27: <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	108
Figura 6	Selección de interacciones antagónicas entre endófitos competitivos y fitopatógenos de importancia agrícola. GSE18: <i>Xylaria</i> sp., GSE10: <i>Nodulisporium</i> sp.	110
Figura 7	Colonias de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a, hongo endófito aislado de <i>Gliricidia sepium</i> , <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Pythium aphanidermatum</i> a diferentes días de crecimiento. Reemplazo de <i>Ph. capsici</i> y <i>P. aphanidermatum</i> por <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	112
Figura 8	Bioensayo de antagonismo múltiple directo entre el endófito <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a y los microorganismos fitopatógenos de interés agrícola a los seis días de interacción.	117

	Página
Figura 9 <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a anamorfo de <i>Hypoxylon anthochroum</i> .	133
Figura 10 Análisis Neighbor-Joining de las secuencias de GenBank con identidad más alta (>95%) con la secuencia del ITS-5.8s del aislamiento GS4d2II1a.	134
Figura 11 Cromatografía en capa fina de los extractos del medio de cultivo y micelio del endófito <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	135
Figura 12 Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 28 .	140
Figura 13 Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 28 .	141
Figura 14 Estructura el compuesto 28 , la 7-Hidroxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona, obtenida a través de difracción de Rayos X.	141
Figura 15 Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 29 .	142
Figura 16 Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 29 .	142
Figura 17 Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 30 .	143
Figura 18 Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 30 .	143
Figura 19 Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 31 .	144
Figura 20 Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la isobenzofuranona 31 .	144
Figura 21 Cambios morfológicos en las colonias de los fitopatógenos provocados por las isobenzofuranonas 28-30 .	149
Figura 22 Preparación microscópica del micelio de <i>Pythium aphanidermatum</i> teñido con Rojo Congo, x400.	150
Figura 23 Interacciones antagónicas a las tres semanas en medio agar papa-dextrosa, PDA, (A) y en medio arroz, MA, (B).	151

	Página
Figura 24	A. Control <i>Pythium aphanidermatum</i> . B. Control <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a. C-E. Zona de interacción antagónica. <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a (flechas moradas) y <i>P. aphanidermatum</i> (flechas rojas). Tinción con azul de lactofenol, x 400. 152
Figura 25	CCF comparativa de los cultivos en medio arroz (MA). 153
Figura 26	Cromatogramas representativos de los cuatro tratamientos. 162
Figura 27	Diagrama de Venn que muestra los metabolitos volátiles compartidos entre los tratamientos. 162

Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1 Grupos y clases de hongos endófitos.	24
Cuadro 2 Clasificación de las interacciones interespecíficas fúngicas no nutritivas.	32
Cuadro 3 Plantas seleccionadas para el aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos.	52
Cuadro 4 Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados.	58
Cuadro 5 Fraccionamiento primario del extracto del medio de cultivo de mediana escala.	71
Cuadro 6 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 4.	73
Cuadro 7 Número de aislamientos totales y morfotipos puros de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de plantas de la Reserva de Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH).	81
Cuadro 8 Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de <i>Gliricidia sepium</i> .	83
Cuadro 9 Características morfológicas de los hongos fitopatógenos aislados de <i>Gliricidia sepium</i> .	97
Cuadro 10 Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de acuerdo a su tasa de crecimiento.	99
Cuadro 11 Hongos endófitos y fitopatógenos agrupados por su tasa de crecimiento y morfotipo.	99
Cuadro 12 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo I en bioensayos de antagonismo.	100
Cuadro 13 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo II en bioensayos de antagonismo.	101

	Página
Cuadro 14 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo III en bioensayos de antagonismo.	101
Cuadro 15 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo IV en bioensayos de antagonismo.	102
Cuadro 16 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo V en bioensayos de antagonismo.	103
Cuadro 17 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo VI en bioensayos de antagonismo.	103
Cuadro 18 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo VII en bioensayos de antagonismo.	104
Cuadro 19 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos más competitivos de <i>Gliricidia sepium</i> en bioensayos de antagonismo.	106
Cuadro 20 Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos más competitivos de <i>Gliricidia sepium</i> con sus fitopatógenos.	108
Cuadro 21 Porcentajes de inhibición del crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola en bioensayos de antagonismo con los hongos endófitos más competitivos.	109
Cuadro 22 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola y los resultados en los bioensayos de antagonismo directos con <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	111
Cuadro 23 Porcentajes de inhibición de crecimiento radial de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola a los 2, 4, 6 y 8 días de interacción antagónica en los bioensayos de antagonismo múltiples directos con <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	116

	Página
Cuadro 24 Rendimiento de extractos orgánicos de cultivos en pequeña escala de hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> .	119
Cuadro 25 Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	138
Cuadro 26 Constantes espectroscópicas de IR y espectrométricas EM-IE (m/z) de las isobenzofuranonas 28-31 .	139
Cuadro 27 Datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de las isobenzofuranonas 28-31 .	145
Cuadro 28 Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de los compuestos 28-31 .	146
Cuadro 29 Rendimiento de los extractos de cultivos en agar papa-dextrosa (PDA) y medio arroz (MA) de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a y en interacción antagónica con <i>Pythium aphanidermatum</i> .	153
Cuadro 30 Actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los extractos de cultivos en medio arroz (MA) y agar papa-dextrosa (PDA) de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a y en interacción antagónica con <i>Pythium aphanidermatum</i> .	154
Cuadro 31 Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) identificados en <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a cultivado durante 3 días (Nod3) y 5 días (Nod5), en la interacción intraespecífica (Nod-Nod) y en la interacción interespecífica con <i>Pythium aphanidermatum</i> (Nod-Pyt).	158
Cuadro 32 Componentes volátiles y semivolátiles del extracto de medio de cultivo y micelio de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a.	173

Lista de gráficas

		Página
Gráfica 1	Índice de antagonismo (IA) de los hongos endófitos y fitopatógenos de <i>Gliricidia sepium</i> por grupo.	104
Gráfica 2	Índice de antagonismo (IA) de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> más competitivos.	106
Gráfica 3	Índice de antagonismo (IA) de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> más competitivos en interacciones con los hongos y oomicetos fitopatógenos.	109
Gráfica 4	Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación estáticas.	123
Gráfica 5	Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación en agitación.	124
Gráfica 6	Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> cultivados en agar papa-dextrosa (PDA) y medio arroz (MA).	125
Gráfica 7	Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación estáticas.	127
Gráfica 8	Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación en agitación.	128
Gráfica 9	Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de <i>Gliricidia sepium</i> cultivados en agar papa-dextrosa (PDA) y medio arroz (MA).	129

	Página
Gráfica 10 Actividad antifúngica y antioomiceto del medio de cultivo y micelio de los extractos orgánicos derivados del cultivo en mediana escala de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a, sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos de importancia agrícola.	136
Gráfica 11 Actividad fitotóxica del medio de cultivo y micelio de los extractos orgánicos derivados del cultivo en mediana escala de <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a, sobre el crecimiento de la raíz de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> .	136
Gráfica 12 Efecto fitotóxico las fracciones primarias sobre el crecimiento de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> .	137
Gráfica 13 Actividad biológica de los compuestos 28-31 .	148
Gráfica 14 Clasificación química de los metabolitos orgánicos volátiles producidos por <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a y contenido relativo por tratamiento (%). <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a a los 3 días (Nod3), y 5 días (Nod5) de crecimiento, interacción intraespecífica (Nod-Nod) e interespecífica con <i>Pythium aphanidermatum</i> (Nod-Pyt).	156
Gráfica 15 Los diez compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con la más alta afinidad a la fibra (% Área) en los diferentes tratamientos: <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a a los 3 (Nod3), y 5 días (Nod5) de crecimiento, en la interacción intraespecífica (Nod-Nod) e interespecífica con <i>Pythium aphanidermatum</i> (Nod-Pyt).	157
Gráfica 16 Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA) de la asociación entre la diversidad de los compuestos orgánicos volátiles que pertenecen a las principales familias químicas y el contenido relativo de estos compuestos para cada condición experimental.	164
Gráfica 17 Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA) del perfil de compuestos orgánicos volátiles obtenido durante cada condición experimental.	166

Lista de abreviaturas

AA	Agar agua
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CG	Cromatógrafo de gases
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
COSY	Correlated spectroscopy (espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo papa dextrosa
°C	Grados Celsius
<i>d</i>	Doblete
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer (experimento de desacoplamiento de protones)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleótido
EM	Espectrometría de masas
eV	Electrón volts
Fx	Fracción
g	Gramos
h	Horas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
IA	Índice de antagonismo
IE	Impacto electrónico
IK	Índice de Kovats
IR	Infrarrojo
ITS	Regiones espaciadoras internas transcritas
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro
m	Metro
M ⁺	Ion molecular

m/z	Unidades de masa/carga
MA	Medio arroz
MCA	Análisis de Correspondencias Múltiples
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro cuadrado
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ng	Nanogramo
OA	Agar avena
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa-dextrosa
<i>Ph.</i>	<i>Phytophthora</i>
pm	Picomol
pM	Picomolar
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
p/v	Peso/volumen
REBIOSH	Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla
RMN- ¹³ C	Resonancia Nuclear Magnética de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Nuclear Magnética de protón
rpm	Revoluciones por minuto
R.T.	Tiempo de retención
s	Segundo
s	singulete
SPME	Microextracción en fase sólida
TOF	Tiempo de vuelo
TAE	Tris-acetato-EDTA
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación
VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles
vs	Contra
δ	Desplazamiento químico
v_{max}	Frecuencia máxima

Resumen

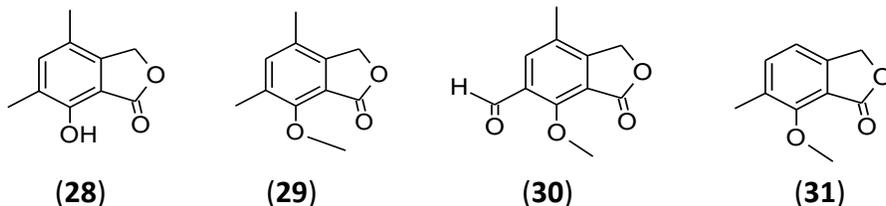
El presente proyecto se realizó con la finalidad de establecer los mecanismos físicos y químicos involucrados en las relaciones que se dan entre los hongos endófitos *in vitro* e inferirlos dentro de su hospedera; asimismo, establecer los mecanismos involucrados en las relaciones entre los hongos endófitos y los hongos y oomicetos fitopatógenos, además de evaluar el efecto fitotóxico de los extractos de los hongos endófitos, contribuyendo así, con el desarrollo de nuevos agentes agroquímicos o de control biológico. Por un lado, se describe el tipo de interacciones *in vitro* entre hongos endófitos aislados de una planta que crece en una zona de alta biodiversidad, *Gliricidia sepium* (Fabaceae), y entre hongos endófitos y microorganismos fitopatógenos. Los fitopatógenos empleados fueron los hongos aislados de *G. sepium* y hongos y oomicetos con importancia agrícola. Por otra parte, este trabajo incluye el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios bioactivos producidos por el hongo endófito más competitivo, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Finalmente, se describe la identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por el aislamiento *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en dos tiempos de crecimiento, y en interacción antagónica intra e interespecífica con el oomiceto *Pythium aphanidermatum*.

En los bioensayos de antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos de *G. sepium* se presentaron varios tipos de interacciones, las cuales fueron: cohabitación, antagonismo, coantagonismo y agonismo. Asimismo, en los bioensayos de antagonismo, entre los endófitos más competitivos y los hongos y oomicetos de importancia agrícola, se observaron interacciones agonistas, donde el endófito de prueba inhibió el crecimiento de los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *P. aphanidermatum*, creciendo sobre su micelio. En estas interacciones antagónicas intervinieron mecanismos físicos y químicos como la formación de barreras miceliales, reemplazo de micelio, y la producción de metabolitos secundarios.

Los extractos orgánicos derivados de los cultivos, en pequeña escala, de los hongos endófitos más antagónicos, corroboraron que los endófitos en estudio producen metabolitos secundarios, que inhibieron significativamente el crecimiento de los

microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola; y, de igual forma, poseen actividad fitotóxica significativa sobre dos plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*.

El hongo endófito identificado como *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (anamorfo o forma asexual de *Hypoxyton anthochroum*) fue el más competitivo, ya que eliminó a cuatro oomicetos fitopatógenos al crecer sobre ellos en bioensayos *in vitro*, y se observó que sus extractos fúngicos poseen actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica significativa. Por consiguiente, se realizó el estudio químico biodirigido del extracto activo del medio de cultivo, obteniéndose cuatro isobenzofuranonas con actividad antioomiceto y antifúngica contra *P. aphanidermatum*, *Ph. capsici* y *F. oxysporum*, la 7-hidroxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**28**), la 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**), la 6-formil-4-metil-7-metoxi-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**30**), y la 7-metoxi-6-metil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**31**). De las cuales la isobenzofuranona **29** tuvo mayor actividad antifúngica, y la **31** resultó ser un producto natural novedoso.



La identificación de los VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, empleando microextracción en fase sólida, seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitió establecer que la cepa produjo 70 VOCs con actividad antioomiceto y antifúngica, los cuales incluyen una gran cantidad de mono y sesquiterpenos; principalmente, eucaliptol y limoneno. El análisis de correspondencia múltiple (MCA, por sus siglas en inglés) reveló cuatro diferentes perfiles metabólicos, lo que demuestra que los VOCs cambian con la edad del hongo y en las interacciones intra e interespecíficas.

Nodulisporium sp. GS4d2II1a y sus metabolitos secundarios se sugieren como potencialmente útiles para el control biológico de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola.

Abstract

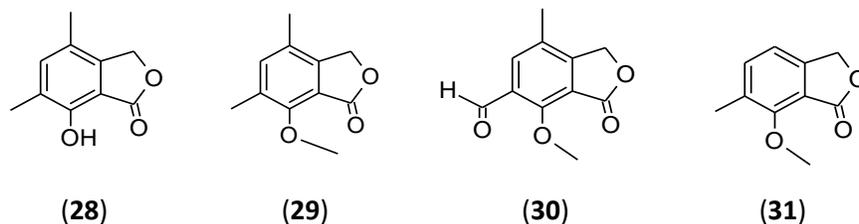
The present study was done in order to establish the physical and chemical mechanisms involved in *in vitro* fungal interactions among endophytes, and infer these mechanisms within their host. In addition, to establish the mechanisms involved in the interactions between endophytes and plant pathogenic microorganisms and, additionally, to evaluate the phytotoxic effect of organic extracts of endophytic fungi besides contributing with the development of new agrochemicals or biological control agents. Firstly, it describes the type of *in vitro* interactions between endophytes isolated from *Gliricidia sepium* (Fabaceae), a plant growing in a high biodiversity area, and between endophytes and plant pathogenic microorganisms. The plant pathogens tested were fungi isolated from *G. sepium*, and fungi and oomycetes with agricultural importance. Moreover, this work includes the isolation and characterization of bioactive secondary metabolites produced by the most competitive endophyte: *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Finally, this study describes the identification of volatile organic compounds (VOCs) produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a at two dates of growth, and in intra and inter-specific interactions with the oomycete *Pythium aphanidermatum*.

The interactions involved in the *in vitro* antagonistic bioassays between endophytes of *G. sepium* were: cohabitation, antagonism, coantagonism, and agonism. Additionally, in the antagonistic bioassays among endophytes and agriculturally important fungi and oomycetes were observed agonistic interactions, where the endophyte inhibited the growth of the plant pathogens *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, and *P. aphanidermatum*, by growing over their mycelia. The mechanisms implicated in the interspecific interactions were physical and chemical, such as, formation of mycelial barriers, replacement of mycelium, and the production of secondary metabolites.

The organic extracts from small-scale fermentations of the most antagonistic fungi confirmed that endophytes produce secondary metabolites that significantly inhibited the growth of agriculturally important plant pathogenic microorganisms; and, similarly, they

have significant phytotoxic activity on two plant tested: *Amaranthus hypochondriacus* and *Solanum lycopersicum*.

The most competitive endophyte was the fungus identified as *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (anamorph or asexual form of *Hypoxyton anthochroum*), it grew over and killed four oomycete plant pathogens in the *in vitro* bioassays; besides, its organic extracts showed significant antifungal, antioomycete, and phytotoxic activity. Therefore, the bioassay-guided fractionation of the culture medium active extract yielded four isobenzofuranones with antioomycete and antifungal activity against *P. aphanidermatum*, *Ph. capsici* and *F. oxysporum*, the 7-hydroxy-4,6-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one (**28**), 7-methoxy-4,6-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one (**29**), 6-formyl-4-methyl-7-methoxy-3*H*-isobenzofuran-1-one (**30**), and 7-methoxy-6-methyl-3*H*-isobenzofuran-1-one (**31**). The isobenzofuranone **29** showed the major antifungal activity and the isobenzofuranone **31** is a novel natural product.



The identification of volatile organic compounds produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a using solid phase microextraction, followed by gas chromatography-mass spectrometry, established that the strain produced 70 VOCs with antioomycete and antifungal activity, mainly including mono- and sesquiterpenes, especially eucalyptol and limonene. Multiple correspondence analysis revealed four different volatile profiles, showing that volatiles changed with the fungus age and its intra and interspecific interactions.

Nodulisporium sp. GS4d2II1a and its secondary metabolites are suggested as potentially useful for biological control of fungal and oomycetes plant pathogens of economically important crops.

I. Introducción

Los hongos endófitos son microorganismos que pasan su vida o parte de ella colonizando los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. Todas las plantas están colonizadas por una o varias especies de hongos endófitos, y éstos varían de acuerdo al ecosistema al que pertenece su hospedera, es decir, los hongos que colonizan a las plantas de clima templado son diferentes a los de climas tropicales (Wilson 1995; Schulz & Boyle 2005; Arnold & Lutzoni 2007; Rodriguez et al. 2009; Kusari et al. 2013).

Los hongos endófitos son un grupo polifilético y productores de metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural y actividad biológica. Éstos habitan dentro de los tejidos de su hospedera, en una comunidad fúngica, por consiguiente, interactúan entre ellos y con hongos fitopatógenos por medio de mecanismos físicos y químicos. De esta manera, en algunos casos pueden proteger a su planta hospedera de forma directa e indirecta del ataque de enemigos y competidores; por ello, es probable que los metabolitos secundarios que producen los hongos endófitos en las relaciones bióticas que establecen sean uno de los mecanismos de defensa (Schulz & Boyle 2005; Tuininga 2005; Arnold & Lutzoni 2007; Gao et al. 2010; Kusari et al. 2013).

Dentro de los hongos endófitos, los hongos pertenecientes al género *Nodulisporium* y su teleomorfo (forma sexual) *Hypoxyton* producen compuestos con actividad biológica. Son miembros de la familia Xylariaceae (Ascomycota), y también son productores de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) antimicrobianos (Zhi-Lin et al. 2012; Monaghan, et al. 1995). Los compuestos producidos por las especies de *Nodulisporium* incluyen diversas familias químicas, como diterpenos indólicos, naftalenos, alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, sesquiterpenos y monoterpenos. Los compuestos aislados de las especies de *Nodulisporium* tienen actividad antifúngica contra fitopatógenos, actividad herbicida, insecticida, alguicida y antibacteriana, asimismo, tienen potencial para ser usado como control biológico de microorganismos fitopatógenos y como productor de biodiesel (Monaghan et al. 1995; Hensens et al. 1999; Dai et al. 2006; Matheron & Porchas 2006;

Gerwick 2008; Pontius et al. 2008; Dai et al. 2009; Park et al. 2010; Rehman et al. 2011; Li et al. 2011; Mends et al. 2012; Suwannarach et al. 2013).

Dentro de este contexto, el presente proyecto comprende aspectos de la química ecológica de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de las hojas de plantas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH), particularmente, los de *Gliricidia sepium* (Fabaceae). El posible papel que desempeñan los metabolitos secundarios en las interacciones se estableció en bioensayos *in vitro* con los endófitos y fitopatógenos. Además, se estudió el potencial biológico de sus extractos orgánicos sobre el crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia en la agricultura, y sobre plantas de prueba. Asimismo, el proyecto de tesis comprendió el estudio químico biodirigido del hongo endófito más competitivo, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y la identificación de los compuestos orgánicos volátiles con propiedades antimicrobianas.

El estudio de las relaciones entre estos organismos favorecería el descubrimiento de nuevos agentes agroquímicos o de control biológico.

II. Antecedentes

1. Definición de hongo endófito

La palabra 'endófito' etimológicamente significa 'dentro de la planta' (*endon*: dentro, *phyton*: planta). Los microorganismos endófitos comprenden a las bacterias, hongos, virus, algas e insectos. Sin embargo, se ha aislado con mayor frecuencia a los hongos como endófitos, que a las bacterias y demás microorganismos (Wilson 1995; Kusari et al. 2013).

Los hongos endófitos son microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando internamente los tejidos vivos de la planta hospedera, sin causar síntomas de enfermedad o mostrar signos de habitación. Son un grupo diverso y polifilético que se ha encontrado en diferentes órganos de todas las plantas, desde los ecosistemas naturales hasta en los campos agrícolas (Schulz & Boyle 2005; Arnold & Lutzoni 2007; Rodríguez et al. 2009; Yu et al. 2010; Kusari et al. 2013).

El endofitismo es una asociación costo-beneficio de una planta y un microorganismo definida por su localización y no por su función (Kusari et al. 2013).

2. Clasificación de los hongos endófitos

Históricamente, los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida (Arnold et al. 2003; Schulz & Boyle 2005; Herre et al. 2007). Rodríguez y colaboradores (2009) clasifican a los hongos endófitos tomando en cuenta el género al que pertenecen, sus plantas hospederas, evolución y funciones ecológicas. En esta clasificación se conservan los grupos Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, donde este último se divide en tres clases. Los hongos endófitos Clavicipitáceos infectan a los pastos y los no Clavicipitáceos infectan tejidos de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. En el Cuadro 1 se presenta esta clasificación, mostrando además, los géneros de hongos endófitos que pertenecen a cada clase, los cuales varían dependiendo del grupo al que pertenezcan y del hábitat, por ejemplo, la composición de hongos endófitos es diferente en zonas templadas y en el trópico (Gamboa-Gaitán 2006; Rodríguez et al. 2009; Weber 2009; Sánchez-Fernández et al. 2013).

Cuadro 1. Grupos y clases de hongos endófitos

	Clavicipitáceos (Endófitos de pastos)	No Clavicipitáceos		
Criterio	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de Hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión*	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementan biomasa de la planta, tolerancia a sequía, producen metabolitos secundarios tóxicos a herbívoros	Incrementan biomasa de la planta, tolerancia a estrés biótico y abiótico, protección de hongos patógenos por metabolitos secundarios	Inducen resistencia a enfermedades, protección contra herbívoros, cambios en sensibilidad a estrés abiótico, mediante la producción de metabolitos secundarios	Protección contra patógenos, metabolitos secundarios tóxicos a herbívoros
Géneros	<i>Balansia, Epichloë/Neotyphodium, Cordyceps, Claviceps</i>	Ascomicetos y menormente basidiomicetos. Ejemplo: <i>Phoma, Curvularia, Fusarium, Colletotrichum, Cryptosporiopsis</i>	Ascomicetos y en menor proporción basidiomicetos. Ejemplo: <i>Xylaria, Colletotrichum, Phomopsis, Nodulisporium, Guignardia, Acremonium, Aspergillus, Fusarium</i>	Endófitos de septo oscuro (DSE, por sus siglas en inglés). Ejemplo: <i>Chloridium, Leptodontium, Phialocephala, Phialophora</i>

*Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas y horizontal, se adquieren del ambiente (Rodríguez et al. 2009).

3. Relaciones que se establecen entre los hongos endófitos y sus hospederas

Se ha observado que la relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis (Rodríguez et al. 2009; Strobel et al. 2004). En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos; el hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos secundarios fitotóxicos y la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas (enzimas y metabolitos secundarios antimicrobianos) (Figura 1). En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y la etapa de desarrollo de ambos organismos, así, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad. Por el contrario, si los mecanismos de defensa de la planta anulan a los factores de virulencia, el hongo perece (Schulz & Boyle 2005; Kusari et al. 2012; Sánchez-Fernández et al. 2013).

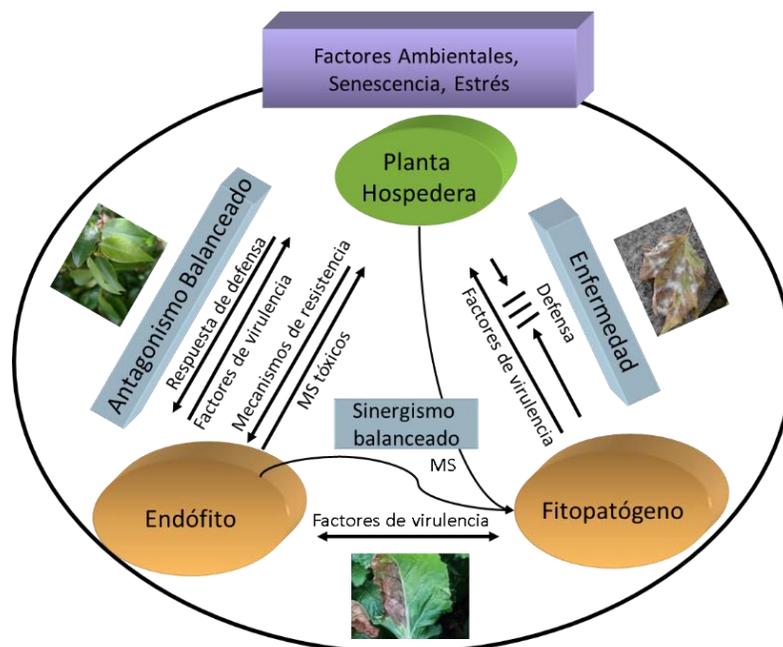


Figura 1. Hipótesis del Antagonismo Balanceado. Modificado de Schulz & Boyle 2005 y Kusari et al. 2012. MS: metabolitos secundarios.

Asimismo, algunos endófitos pueden ser patógenos latentes que son influenciados por factores intrínsecos o ambientales para expresar factores que conllevan a la patogenicidad. Un ejemplo es la expresión del gen de la proteína cinasa *sakA* del hongo endófito *Epichloë festucae*, el cual es activado bajo estrés y por mitógenos, y es vital para el mantenimiento de la asociación mutualista con su hospedera *Lolium perenne* (raigrás perenne), previniendo así, que se convierta en patógeno (Eaton et al. 2011).

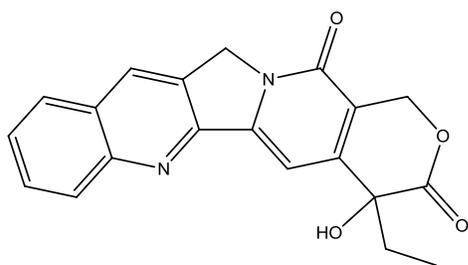
4. Metabolitos secundarios de hongos endófitos

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos de distribución restringida, derivados de los metabolitos primarios, y cuyas funciones son variadas, por ejemplo, funcionan como defensa contra depredadores, como atrayentes de la misma u otra especie, como pigmentos, etc., siendo lógico asumir que todos juegan un rol vital para el bienestar del organismo productor (Dewick 2009). Hay por lo menos 200,000 metabolitos secundarios con actividad biológica, de los cuales, más de 20,000 metabolitos bioactivos son de origen microbiano (Selim et al. 2012).

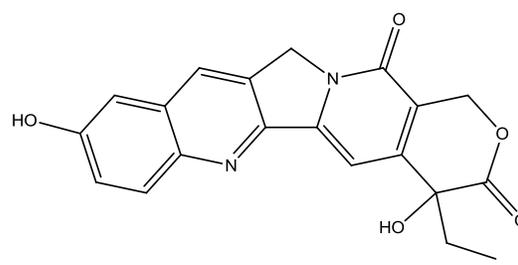
Los hongos son un grupo de organismos importantes al ser productores de metabolitos secundarios novedosos, constituyendo así, una fuente de moléculas potencialmente útiles, para su uso en la agricultura, en la medicina y en la industria. Los hongos endófitos son un gran recurso de diversidad genética y son capaces de producir metabolitos secundarios novedosos, debido a que crecen en una gran variedad de hábitats (Selim et al. 2012; Guzmán-Trampe et al. 2015).

Los metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos pertenecen a diversos grupos estructurales, incluyendo esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, quinonas, terpenoides, depsipéptidos, alcaloides, flavonoides y compuestos alifáticos, entre otros. Son sintetizados primordialmente por la vía de los policétidos (acetato-malonato), la vía del ácido mevalónico, y usando la síntesis de proteínas no ribosomales (Schulz & Boyle 2005; Yu et al. 2010). Incluso se ha visto que los hongos endófitos producen los precursores o los metabolitos secundarios con actividad biológica, cuya síntesis se le había atribuido a la planta (Strobel et al. 2004; Herre et al. 2005; Guzmán-Trampe et al. 2015). Esto se ha

observado principalmente en las interacciones entre los pastos y sus hongos endófitos, sin embargo, en los hongos endófitos que colonizan a las plantas leñosas (árboles o arbustos) se ha comprobado en escasas ocasiones (Schulz & Boyle, 2005; Herre et al. 2005; Herre et al. 2007). Un ejemplo es la producción de camptotecina (**1**) y de 10-hidroxicamptotecina (**2**) dos alcaloides quinolínicos anticancerígenos que se aislaron inicialmente de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) y que también poseen actividad insecticida contra *Musca domestica* (Muscidae) y *Spodoptera exigua* (Noctuidae), y antifúngica contra los fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Pestalotia guepinii*, *Drechslera* sp. y *Fusarium avenaceum* al inhibir el complejo de la topoisomerasa I-DNA de los hongos, es decir, interviene en la replicación y transcripción del DNA. A la fecha, se han reportado varios hongos endófitos productores de estos compuestos, como son los hongos *Entrophosphora infrequens* y *Neurospora* sp. aislados de *Nothapodytes foetida* (Icacinaceae) y productores de camptotecina; *Xylaria* sp. y *Fusarium solani* aislados de *C. acuminata* que producen análogos de la camptotecina, como la 10-hidroxicamptotecina. *Fusarium solani*, además biosintetiza camptotecina (Kusari et al. 2011; Kusari et al. 2012; Deng et al. 2014; Guzmán-Trampe et al. 2015).



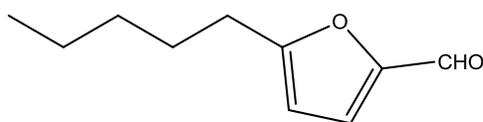
(1)



(2)

Los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos también pueden dividirse en compuestos volátiles y no volátiles (Yu et al. 2010; Zhi-Lin et al. 2012). Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son metabolitos importantes en la ecología química de los hongos al mediar las relaciones ecológicas, como la comunicación intra e interespecíficas y como compuestos de defensa (Effmert et al. 2012; Spraker et al. 2014). Los hongos productores de VOCs pueden ser usados como agentes de control biológico

(micofumigación), debido a la actividad antimicrobiana que presentan sobre el crecimiento de otros microorganismos (Stinson et al. 2003). Los hongos endófitos pertenecientes al *phylum* Ascomycota son productores de una gran cantidad de VOCs y los miembros de la familia Xylariaceae son una fuente especialmente rica. Los VOCs detectados con mayor frecuencia en los hongos endófitos incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, ésteres, alcoholes, cetonas, lípidos, ácidos, compuestos aromáticos simples, derivados reducidos del naftaleno y alcanos (Zhi-Lin et al. 2012). Los hongos endófitos pertenecientes a los géneros *Muscodora*, *Nodulisporium*, *Phoma*, *Hypoxyton*, *Gliocladium*, *Fusarium* y *Ascocoryne*, entre otros, son productores de una amplia gama de compuestos volátiles bioactivos (Zhi-Lin et al. 2012). Así, por ejemplo, el hongo endófito *Oxyporus latemarginatus* EF069 aislado de *Capsicum annum* L., produce VOCs antifúngicos que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos *A. alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *Rhizoctonia solani* por micofumigación. Asimismo, el compuesto volátil 5-pentil-2-furaldehído (**3**) inhibe el crecimiento de *R. solani* (Lee et al. 2009).



(3)

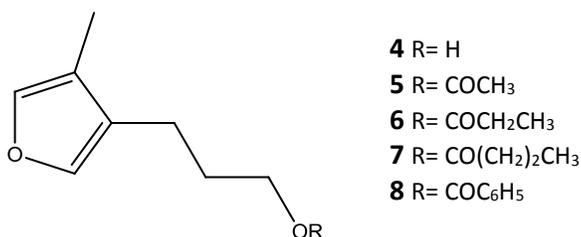
5. Mecanismos de protección de los hongos endófitos a sus plantas hospederas

Los hongos endófitos usualmente toman nutrientes y protección de su hospedera, y en retribución, algunos de ellos pueden desempeñar un papel mutualista, ya que pueden beneficiarla induciendo su crecimiento, aumentando su tolerancia al estrés y produciendo metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural, que le proporcionan protección y resistencia contra microorganismos fitopatógenos y/o herbívoros. Por lo que puede ser posible para algunos endófitos ayudar a la planta hospedera en la defensa química (sinergismo balanceado, Figura 1) (Strobel et al. 2004; Rodríguez et al. 2009; Gao et al. 2010; Kusari et al. 2012). Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben

a un patógeno en particular o a otros hongos endófitos, sin embargo, puede no inhibir a otros organismos de su mismo entorno (Arnold et al. 2003). Algunos hongos endófitos, a través de metabolitos secundarios o aleloquímicos, inducen los efectos alelopáticos de su hospedera, es decir, influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes (Tan & Zou 2001; Strobel et al. 2004).

Los mecanismos por los cuales los hongos endófitos podrían contribuir a la protección de su hospedera contra patógenos son (Herre et al. 2007; Gao et al. 2010; Zhi-Lin et al, 2012):

1) Directos: induciendo defensas anti-patógeno, mediante enzimas y/o metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, producidas directamente por el hongo endófito y extrínsecos a su planta hospedera. Un ejemplo de este mecanismo es la producción de compuestos repelentes de insectos por el hongo *Biscogniauxia atropunctata* aislado de la planta *Setaria viridis* (L.) Beauv. Los compuestos aislados fueron ensayados contra la chinche del arroz *Eysarcoris ventralis* (Westwood), la mayor amenaza en los cultivos de arroz en Asia y hospedero de las especies de *Setaria*. El compuesto 3-(4-metilfuran-3-il)propan-1-ol (**4**) y sus derivados semisintéticos de acilo (**5-8**) tuvieron efecto repelente entre el 40 y ~100%, cuyos porcentajes eran comparables al efecto provocado por el naftaleno. Los compuestos **4**, **6** y **7** mostraron alta repelencia. La presencia y acumulación del compuesto **4** en la planta puede protegerla del ataque de las chinches y, además, los compuestos pueden ser utilizados como un método de protección del cultivo de arroz (Nakajima et al. 2010).



2) Indirectos: induciendo o incrementando la expresión de mecanismos de defensas químicas o fisiológicas, intrínsecas a su planta hospedera. Por ejemplo, la presencia de *Neotyphodium lolii*, endófito de *L. perenne*, reduce las lesiones causadas por los patógenos

foliares *A. alternata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium avenaceum* y *Bipolaris sorokiniana*, al promover un aumento en la actividad de las enzimas reguladoras de especies reactivas de oxígeno (ROS): superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD) de la planta, debido a que cuando la planta se encuentra en estrés biótico se produce mayor cantidad de ROS (Tian et al. 2008).

3) Ecológicos: por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y depredación. Un ejemplo es el género *Trichoderma*. En el estudio conducido por Bae y colaboradores en el 2011, se aislaron diferentes endófitos pertenecientes al género *Trichoderma* de diferentes plantas tropicales, y se evaluaron contra el oomiceto fitopatógeno *Phytophthora capsici* en plantas de Chile (*C. annuum*). Cinco de los aislamientos estudiados se consideran endófitos de *C. annuum*, ya que penetraron y sobrevivieron en sus raíces sin causar daño observable y, dependiendo de la cepa, retrasaron el desarrollo de la enfermedad por *Ph. capsici*. Tres aislamientos de *Trichoderma* sp. eliminaron por completo el crecimiento de *Ph. capsici* en cocultivo, y dos de ellos penetraron las hifas de *Ph. capsici*, por lo que es posible que el hiperparasitismo contribuye a su capacidad para retrasar la enfermedad. Por otro lado, cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp. inhibieron el crecimiento de *Ph. capsici* por medio de la producción de metabolitos extracelulares (Bae et al. 2011).

El predominio en mayor o menor grado de cualquiera de estos mecanismos tiene distintas consecuencias sobre la ecología y evolución de las relaciones planta hospedera-endófito-patógeno (Herre et al. 2007). De manera adicional, estos mecanismos pueden actuar en conjunto, por ejemplo cuando el hongo produce compuestos volátiles y no volátiles con actividad antifúngica contra fitopatógenos, y por micoparasitismo y depredación, limitando el crecimiento del patógeno. Por lo que estos mecanismos pueden ser los responsables de su supervivencia dentro de la hospedera (Gams et al. 2004; Gao et al. 2010).

6. Interacciones interespecíficas entre hongos

Las plantas, al estar colonizadas por una gran número de hongos endófitos, interactúan entre ellos e incluso con otros simbiosistas, como son las bacterias endófitas (Arnold et al. 2003; Herre et al. 2005; Herre et al. 2007; Kusari et al. 2012). De acuerdo a la clasificación

de Tuininga (2005) las interacciones fúngicas se clasifican en interacciones nutritivas y no nutritivas, dependiendo si involucran o no la adquisición de nutrientes.

Las interacciones nutritivas incluyen a la biotrofia, necrotrofia y saprotrofia. La biotrofia es la obtención de nutrientes de las células vivas del hospedero, por ejemplo el parasitismo; la necrotrofia es la adquisición de nutrientes al eliminar a un organismo, el micoparasitismo y la depredación son ejemplos de esta interacción; y por último, la saprotrofia que es la adquisición de nutrientes de material muerto, por ejemplo la descomposición.

El término micoparasitismo se aplica estrictamente a las relaciones en las que un hongo sirve como una fuente de nutrientes para otro, aunque este tipo de flujo de nutrientes rara vez se ha demostrado. Los micoparásitos pueden ser necrótrofos y biótrofos, dependiendo si eliminan o no al hospedero. Un ejemplo de hongo micoparásito es *Trichoderma* (Jeffries 1995; Gams et al. 2004).

Por otro lado, las interacciones no nutritivas, no involucran la adquisición de nutrientes, estas son: coantagonismo (-/-), antagonismo (-/0), agonismo (-/+), cohabitación (0/0), comensalismo (0/+) y mutualismo (+/+). Cada una se distingue por el efecto que tiene un hongo sobre otro e intervienen diferentes mecanismos que pueden actuar en conjunto (Cuadro 2). Los mecanismos pueden clasificarse en (Widden 1997; Boddy 2000; Tuininga 2005):

- 1) Físicos o directos: por interacciones entre hifas, interferencia hifal, y por contacto de micelio.
- 2) Químicos o indirectos: mediante la producción de compuestos solubles, metabolitos secundarios o aleloquímicos, algunos metabolitos primarios y enzimas o compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento de las hifas del competidor.

Cuadro 2. Clasificación de las interacciones interespecíficas fúngicas no nutritivas

Término	Resultado	Efecto	Mecanismos
Coantagonismo	-/-	Muerte, disminución del crecimiento de ambos competidores	Lisis, vacuolación, cambios en pH, interferencia (coaleopatía, coantibiosis), inhibición física, competencia nutricional (explotación, captura de recursos primaria), cese de crecimiento donde hay contacto (<i>deadlock</i>), defensa
Antagonismo	-/0	Muerte, disminución del crecimiento de un competidor	Lisis, vacuolación, cambios en pH, interferencia (alelopatía, antibiosis), inhibición física
Agonismo	-/+	Disminución del crecimiento de un competidor y aumento del crecimiento del otro, creciendo encima de la colonia del competidor	Interferencia (alelopatía, antibiosis)
Cohabitación	0/0	Neutralismo, es decir ningún competidor se afecta o beneficia	Entremezcla de micelios
Comensalismo	0/+	Un competidor no se afecta y el otro incrementa su crecimiento	Entremezcla de micelios, exudación
Mutualismo	+/+	Aumento del crecimiento del ambos competidores	Entremezcla de micelios, exudación

Modificado de Tuininga 2005.

Un ejemplo de interacción no nutritiva y los mecanismos que involucra es el agonismo. En el agonismo, aunque una colonia crezca encima del competidor, no necesariamente involucra algún tipo de adquisición de nutrientes. Es decir, un hongo "A" puede inhibir a un hongo "B" por medio de alelopatía (metabolitos secundarios) y, después crecer en dirección del hongo "B" y finalmente capturar el espacio ocupado anteriormente por "B", por lo que el hongo "A" se puede beneficiar de los cambios que el hongo "B" haya realizado en el sustrato. En este caso, el hongo "A" no está recibiendo nutrientes directamente del hongo "B", como en el parasitismo, pero se beneficia del hongo "B". Sin embargo, los mecanismos

nutritivos y no nutritivos pueden actuar simultáneamente y cambiar a través del tiempo, por ejemplo un hongo puede ser agonista y micoparásito, como los micoparásitos *Acremonium strictum*, *Clonostachys rosea*, *Trichothecium roseum* y *Sistotrema brinkmannii* que crecen sobre las colonias de otros hongos sin que ellos se inhiban. Después de la infección, usualmente el hongo parasitado ya no puede ser recuperado (Gams et al. 2004; Tuininga 2005).

Por otro lado, un ejemplo de mecanismo que involucra el contacto físico de las hifas es la interferencia hifal. Esta se produce cuando el micelio de un hongo crece cerca (a menos de 50 mm) o en contacto con el de otra especie y reduce el crecimiento del segundo hongo causando perturbaciones citoplasmáticas y destrucción de las hifas. Estudios de microscopía electrónica han revelado vacuolización, o una abundancia de gotitas de lípidos e invaginaciones de la membrana plasmática del hospedero en el punto de contacto con este. Sin embargo, este mecanismo es mediado por la liberación de metabolitos secundarios (Gams et al. 2004; Boddy 2000).

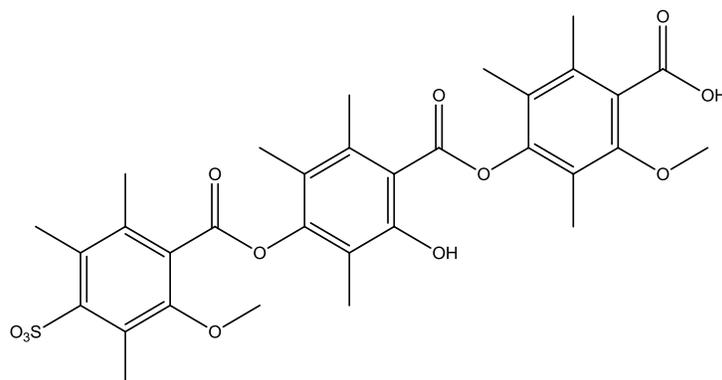
Otra forma de clasificar las interacciones es describir el resultado de la interacción, es decir, muerte, inhibición o estimulación del crecimiento, crecimiento entremezclado, inhibición a distancia, reemplazo parcial o total de uno de los competidores, y darle puntos a cada resultado, con el fin de obtener un valor o índice de antagonismo o de combate, que indica cuál es el hongo más competitivo, donde el más competitivo obtiene un valor más alto (Yuen et al. 1999; Rotheray et al. 2011). Por lo que esta forma de clasificación es muy útil para la selección de hongos objeto de estudio, ya que se ha observado que en algunas interacciones en cultivos *in vitro*, los hongos antagonistas producen metabolitos primarios y secundarios con propiedades antifúngicas tales como enzimas, compuestos difusibles, y compuestos volátiles que inhiben el competidor fúngico a distancia. La zona de interacción del antagonismo fúngico también implica hifas muertas por micoparasitismo, pigmentos, y cambios de morfología de los micelios (Shearer 1995; Yuen et al. 1999; Gams, 2005; Hynes et al. 2007; Rotheray et al. 2011).

En la actualidad, son escasos los estudios que establecen cómo son las interacciones interespecíficas en las comunidades fúngicas en la naturaleza y la importancia de los

compuestos antimicrobianos en estas interacciones (Shearer 1995; Yuen et al. 1999; Hynes et al. 2007; Rotheray et al. 2011). Por lo que el estudio de estas interacciones conduce al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos, en su mayoría estructuralmente diversos y novedosos, constituyendo así, moléculas potencialmente útiles para su uso en la agricultura. Además, mediante estos estudios es posible seleccionar especies útiles como agentes de control biológico (Shearer 1995; Yuen et al. 1999; Tan & Zou 2001; Strobel et al. 2004).

6.1 Producción de metabolitos secundarios en cocultivos

Hay que resaltar que casi todos los trabajos acerca de la obtención de metabolitos secundarios de hongos endófitos se realizan bajo condiciones de monocultivos axénicos, sin embargo, los hongos endófitos conviven dentro de la planta entre ellos y con las bacterias endófitas, por lo que el estudio de la producción de metabolitos bioactivos debe realizarse en cocultivos (Kusari et al. 2012). Los cocultivos involucran el cultivo de dos o más microorganismos en el mismo ambiente, que puede ser en medios sólidos o líquidos. En estos cultivos se pueden activar grupos de genes que están silenciados bajo las condiciones de cultivo estándares en el laboratorio (Bertrand et al. 2014). Un ejemplo es el aislamiento e identificación de 4''-hidroxisulfoxi-2,2''-dimetiltielavina P (**9**) producida durante el cocultivo de *Trichophyton rubrum* y *Bionectria ochroleuca* (Bertrand et al. 2013).



(9)

Los perfiles de VOCs de los hongos también pueden cambiar cuali y cuantitativamente durante las interacciones inter e intraespecíficas (Evans et al. 2008) y en las interacciones antagónicas con bacterias (Minerdi et al. 2009; Spraker et al. 2014). Existen algunos reportes sobre los cambios en la producción de volátiles en las interacciones interespecíficas entre saprobios y basidiomicetos descomponedores de madera, como *Sterium gausapatum* y *Trametes versicolor* (Evans et al. 2008; Hynes et al. 2007), y entre la bacteria y el hongo *Ralstonia solanacearum* y *Aspergillus flavus* (Spraker et al. 2014), que exploran el papel ecológico de los compuestos volátiles producidos por los hongos y su posible aplicación en la agricultura.

Sin embargo, hasta la fecha, no existen informes sobre los cambios en la producción de compuestos volátiles entre un hongo endófito y un oomiceto fitopatógeno en interacción antagónica, ya que los metabolitos producidos son probablemente responsables de la actividad biológica observada en cocultivo. Generalmente, esta bioactividad se atribuye a los metabolitos secundarios producidos por endófitos cuando se cultiva en condiciones de monocultivo axénicos.

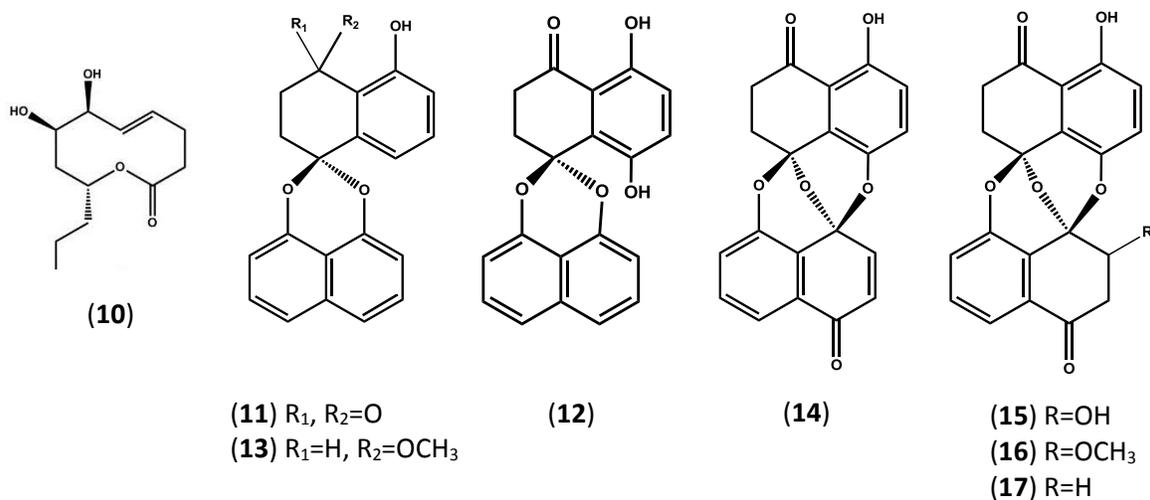
7. Metabolitos secundarios de hongos endófitos con potencial para su uso en la agricultura

La seguridad alimentaria (la disponibilidad de alimentos y el acceso a estos) es cada vez más importante, sobre todo porque se prevé que la población mundial aumente por encima de nueve mil millones en 2050 (Verger & Boobis 2013). El uso de plaguicidas es un tema muy importante, pero su aplicación ha sido motivo de controversia, debido a que representa una ayuda importante en la protección de cultivos, pero han causado daños en la salud humana y en el ambiente (Verger y Boobis 2013). Una alternativa, entre otras, para la protección de cultivos es la aplicación de los metabolitos secundarios o productos naturales, o compuestos inspirados en productos naturales aislados de microorganismos endófitos (Guzmán-Trampe et al. 2015).

Los endófitos producen metabolitos con diversidad química que exhiben aplicaciones potenciales en la agricultura, como antifúngicos, antibacterianos, insecticidas, nematicidas,

entre otros (Kusari et al. 2012; Kumar & Kaushik 2012). Así por ejemplo, el nonenólido (6*S*,7*R*,9*R*)-6,7-dihidroxi-9-propil-non-4-eno-9-lactona (**10**), aislado de *Phomopsis* sp. HCCB03520 que vive en las ramas de *Achyranthes bidentata* en China, mostró actividad fitotóxica sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de *Medicago sativa*, *Trifolium hybridum* y *Buchloe dactyloides*, y aunque la inhibición es menor que la provocada por el herbicida comercial ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)acético (2,4-D), se puede considerar una alternativa al uso de herbicidas comerciales (Ge et al. 2012; Yang et al. 2012).

Otro ejemplo es la producción de metabolitos antifúngicos y fitotóxicos del hongos endófito *Edenia gomezpompae*, aislado de *Callicarpa acuminata*. Los compuestos aislados fueron las palmarumucinas CP₂ (**11**), CP₁₇ (**12**) y CP₁₉ (**13**), y las preusomerinas EG₁ (**14**), EG₂ (**15**), EG₃ (**16**) y EG₄ (**17**). Los compuestos **11**, **14**, **15** y **16** aislados del micelio poseen actividad antifúngica contra los fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*. Asimismo, estos compuestos tuvieron actividad fitotóxica sobre la germinación, el crecimiento de la raíz y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Echinochloa crus-galli*. Los compuestos **14**, **16** y **17** mostraron mayor actividad sobre la germinación de las semillas y los compuestos **13**, **15** y **16** inhibieron significativamente el crecimiento de la raíz de las tres plantas blanco, por último, los compuestos **13**, **14** y **17** inhibieron la respiración en las tres plantas y en mitocondrias de espinaca. Finalmente, las preusomerinas **14** y **17**, y las palmarumucinas **11** y **12**, inhiben la síntesis de ATP de H₂O a metilviológico, y el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado en cloroplastos de espinaca, comportándose como inhibidores potentes de la reacción de Hill. El sitio de inhibición está localizado en el fotosistema II, entre P₆₈₀ y Q_A (Macías-Rubalcava et al. 2008; Macías-Rubalcava et al. 2014a; Macías-Rubalcava et al. 2014b).



Los metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos además de su potencial como bioplaguicidas, permiten seleccionar a los microorganismos que puedan ser empleados como agentes de control biológico (Tripathi et al. 2008; Glare et al. 2012; Sánchez-Fernández et al. 2013).

Bioplaguicida es un término que se ha aplicado a las preparaciones que contienen organismos vivos (bacterias, virus, hongos, protozoos y nematodos), una definición más amplia, abarca compuestos botánicos y semioquímicos (por ejemplo, las feromonas) producidos directamente por estos microorganismos, que se utilizan para suprimir las poblaciones de plagas, incluyendo insectos, patógenos y malezas (Tripathi et al. 2008; Glare et al. 2012). En contraste con el control biológico clásico, el término bioplaguicida se refiere a que éste debe aplicarse en repetidas ocasiones a las áreas infestadas de plagas debido a que sus poblaciones no son auto sostenibles durante más de una estación de crecimiento, y a que no son capaces de extenderse más allá de la zona de aplicación. Asimismo, se incluyen a los endófitos que son introducidos en las plantas, ya sea durante la producción de semillas o de propagación, y que tienen propiedades plaguicidas, a pesar de que no se consideran tradicionalmente como tales, donde el endófito es un microorganismo plaguicida y la planta actúa como un sistema de entrega (Glare et al 2012).

Por otra parte, el término control biológico se refiere a la supresión de las actividades dañinas de un organismo por otro organismo y se ha utilizado en diferentes campos de la

biología. En la fitopatología, el término se aplica a la utilización de antagonistas microbianos para suprimir enfermedades, así como, el uso de patógenos específicos del hospedero para controlar las poblaciones de malezas. En ambos campos, el organismo que suprime la plaga o patógeno se conoce como el agente de control biológico (Tripathi et al. 2008).

Un ejemplo de bioplaguicida son las especies de *Trichoderma*, las cuales, como ya se ha mencionado, producen metabolitos secundarios y enzimas, y son conocidas como micoparásitos. *Trichoderma* inhibe a los fitopatógenos por todos estos mecanismos y por mejorar la resistencia sistémica de la planta (Lorito et al. 2010; Harman 2011). Todas estas propiedades han llevado al desarrollo de biofungicidas con *Trichoderma* spp. como Sentinel™, un biofungicida contra la pudrición en las uvas causada por *Botrytis*, y Vinevax™, una mezcla de cepas de *Trichoderma harzianum* que se introducen en el tronco de la planta y permite la colonización interna de tejido y la supresión de enfermedades del tronco causadas por hongos como *Botryosphaeria* y *Phaeomoniella* (Glare et al. 2012; Guzmán-Trampe et al. 2015).

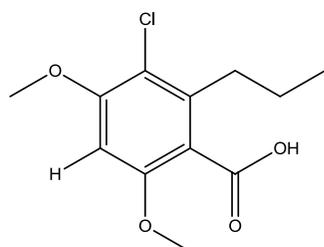
8. El género *Nodulisporium*

La familia *Xylariaceae* está formada por varios géneros, dentro de los cuales *Hypoxylon*, *Nodulisporium* y *Daldinia* constituyen tres de los grupos más grandes e importantes debido a que producen una gran diversidad de metabolitos secundarios (Pinheiro De Carvalho Ribeiro et al. 2012). Las especies de *Nodulisporium* son aisladas frecuentemente, crecen relativamente rápido en cultivo *in vitro*, y se encuentran como hongos endófitos en diferentes partes de plantas tropicales, en plantas en descomposición, restos de cortezas, ramas, y también se han aislado de diferentes partes de plantas tropicales, así como, asociado a algas y como fitopatógenos. Adicionalmente, son productoras de una amplia variedad de metabolitos secundarios con diversidad estructural y variedad de actividades biológicas y, además, tiene potencial como agente de biocontrol (micofumigación) (Monaghan et al. 1995; Hensens et al. 1999; Matheron & Porchas 2006; Dai et al. 2006; Pontius et al. 2008; Dai et al. 2009; Park et al. 2010; Rehman et al. 2011; Li et al. 2011; Suwannarach et al. 2013).

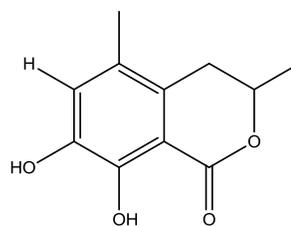
Las especies de *Nodulisporium* son un grupo heterogéneo de hongos anamorfos (fase asexual), muchos de los cuales son estados conidiales de varias especies de los géneros *Daldinia*, *Xylaria*, *Biscogniauxia*, *Hypoxylon*, *Rosellinia* y *Kretzschmaria* (Monaghan et al. 1995; Webster & Weber 2007).

8.1 Metabolitos secundarios aislados del género *Nodulisporium* y su actividad biológica

En la literatura existen relativamente pocos reportes de metabolitos secundarios de *Nodulisporium* sp. aislado como endófito. Como ejemplo, podemos mencionar a *Nodulisporium* sp., endófito de un alga que habita en Grecia, que produce acremonisol A (**18**) y (3R)-7-hidroxi-5-metilmeleina (**19**), dos compuestos novedosos para este género, pero sin actividad biológica reportada (Pontius et al. 2008).



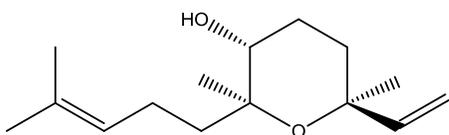
(18)



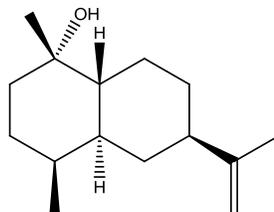
(19)

Asimismo, de *Nodulisporium* sp. A4 endófito *Aquilaria sinensis*, se aislaron 7 compuestos del medio de cultivo: 5-metil-2-viniltetrahidrofuran-3-ol, 6-metil-2-(5-metil-5-viniltetrahidrofuran-2-il)hept-5-en-2-ol, 6- α -hidroxiclonerolidol, (1*S*,4*S*,5*R*,7*R*,10*R*)-10-desmetil-1-metil-11-eudesmeno, tirosol, 8-metoxinaftalen-1-ol y 1,8-dimetoxinaftaleno y 3 compuestos del micelio: ergosterol, peróxido de ergosterol y cerevisterol. Los compuestos 6- α -hidroxiclonerolidol (**20**) y (1*S*,4*S*,5*R*,7*R*,10*R*)-10-desmetil-1-metil-11-eudesmeno (**21**) mostraron inhibición contra líneas celulares tumorales SF268 y NCI-H460, respectivamente (Li et al. 2011).

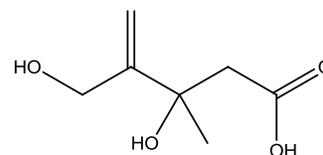
Por otro lado, *Nodulisporium* DA092917 produce un compuesto fitotóxico, el ácido metilidenmevalónico (**22**). Este compuesto y sus derivados son herbicidas contra malezas como *Amaranthus* spp., *E. crus-galli*, *Avena fatua*, entre otras (Gerwick et al. 2008).



(20)

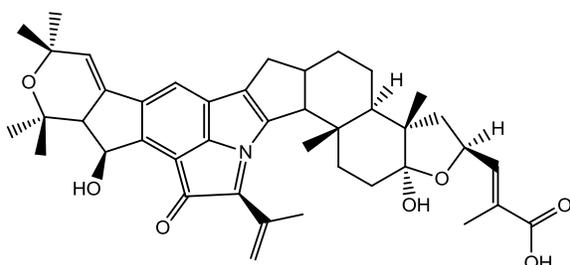


(21)

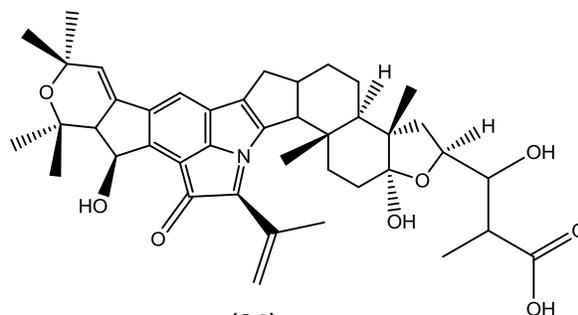


(22)

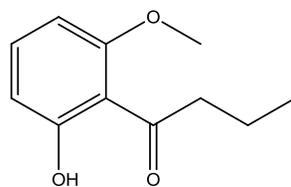
Hensens y colaboradores (1999) aislaron los ácidos nodulispóricos A₁ (**23**) y A₂ (**24**) de *Nodulisporium* sp., los cuales son diterpenos indólicos con propiedades insecticidas contra la mosca verde *Lucilia sericata* (Calliphoridae). Otros estudios reportan que *Nodulisporium* spp. produce compuestos con actividad antimicrobiana (Wu et al. 2010; Rehman et al. 2011). Los extractos de acetato de etilo del cultivo de una especie endófito de *Nodulisporium*, aislada de *Juniperus cedre*, presentaron actividad alguicida, antibacteriana y antifúngica. El fraccionamiento químico biodirigido de este extracto permitió el aislamiento de 7 compuestos nuevos: 3-hidroxi-1-(2,6-dihidroxifenil)-butan-1-ona, 1-(2-hidroxi-6-metoxifenil)butan-1-ona, 2,3-dihidro-5-metoxi-2-metilcromen-4-ona, los naftalenos diméricos nodulisporina A y B, y una indanona dimérica nodulisporina C, así como 4*E*,6*E*-2,4,6-trimetilocta-4,6-dien-3-ona. Solo la 1-(2-hidroxi-6-metoxifenil)butan-1-ona (**25**) fue activa contra la bacteria *Bacillus megaterium*, los hongos *Microbotryum violaceum* y *Septoria tritici*, y el alga verde *Chlorella fusca*, a una concentración de 0.25 mg por sensidisco (Dai et al. 2006).



(23)



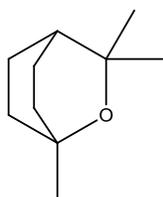
(24)



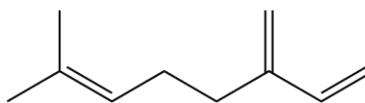
(25)

Adicionalmente, se han identificado VOCs de varias especies endófitas de *Nodulisporium*. Park et al (2010) y Tomscheck et al (2010) reportaron por primera vez que *Nodulisporium* spp. produce compuestos volátiles con actividad antimicrobiana. La mayoría de estos compuestos son alcoholes, ácidos, ésteres y monoterpenos. Tomscheck y colaboradores reportaron que *Hypoxylon* sp. (teleomorfo de *Nodulisporium* sp.) produce 29 compuestos volátiles, incluyendo el eucaliptol (26), el cual se sabe que posee actividad antimicrobiana. Asimismo, *Nodulisporium* sp. aislado como endófito de *Myroxylon balsamum*, produce volátiles con actividad antifúngica contra los fitopatógenos *Aspergillus fumigatus*, *R. solani*, *Phytophthora cinnamomi* y *Sclerotinia sclerotiorum*. La mayoría de estos compuestos son alcoholes, ésteres, cetonas y terpenos (Mends et al. 2012).

Otras especies de *Nodulisporium* productoras de compuestos volátiles se aislaron de hojas y tallos de *Lagerstroemia loudoni*, la cepa CMU-UPE34 produce compuestos volátiles antifúngicos. De los 31 compuestos identificados, 12 fueron terpenos, donde el mayoritario fue el eucaliptol (26), seguido del β -mirceno (27). En bioensayos *in vitro*, la mezcla de compuestos volátiles inhibieron 12 fitopatógenos: *Alternaria porri*, *A. solani*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum musae*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *R. solani* y *Sclerotium rolfsii*. Asimismo, se determinó su actividad *in vivo* (micofumigación) en *Citrus* spp., donde inhibió a los fitopatógenos *P. digitatum* y *P. expansum* (Suwannarach et al. 2013).



(26)



(27)

Estos estudios demuestran que *Nodulisporium* spp. produce compuestos bioactivos con amplia diversidad estructural y que, además, tiene potencial como agente de biocontrol.

9. Criterios para la selección de plantas hospederas

Las relaciones entre los endófitos y sus plantas hospederas han permitido plantear criterios para la selección de plantas que conlleve al aislamiento de hongos endófitos que produzcan metabolitos secundarios potencialmente bioactivos, estos criterios son (Yu et al. 2010; Strobel et al. 2004):

- Plantas sin síntomas de enfermedad que crecen rodeadas de otras plantas infectadas por diversos patógenos (criterio ecológico), las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas.
- Plantas que crecen en lugares de alta biodiversidad y que pueden alojar endófitos igualmente biodiversos.
- Plantas con uso en la medicina tradicional (etnomédico).
- Plantas con estrategias especiales para su supervivencia o que crezcan en ambientes únicos.
- Plantas endémicas, con longevidad inusual o que hayan habitado en un territorio antiguo del planeta.

10. Sitio de recolecta de plantas

La Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH) es un territorio ubicado en la Cuenca del río Balsas, rico en recursos hidrológicos con una importante cubierta forestal. Abarca los estados de Morelos, Puebla y Guerrero. Está compuesta de selva baja mediana caducifolia, bosque de encino y selva baja subcaducifolia (Saldaña Fernández et al. 2007). Al ser una zona con alta diversidad biológica, incrementa la posibilidad de aislar hongos endófitos biodiversos y que al recolectarse además bajo el criterio ecológico, pueden producir metabolitos secundarios con elevada actividad biológica.

Los hongos endófitos objetos de estudio en el presente proyecto son colonizadores de hojas de plantas leñosas, y se encuentran ubicados en la Clase 3 del grupo de hongos no Clavicipitáceos. Esta clase incluye endófitos hiperdiversos asociados con hojas de árboles tropicales, los cuales pertenecen en su mayoría al *phylum* Ascomycota y hongos anamorfos (Rodríguez et al. 2009; Selim et al. 2012).

Cabe señalar que se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos, sin embargo, se conoce relativamente muy poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, a pesar de su abundancia y gran diversidad, particularmente en regiones tropicales (Herre et al. 2007).

El presente proyecto de investigación se enfoca en el estudio de la posible protección de los hongos endófitos a su hospedera mediado por mecanismos directos y ecológicos.

III. Hipótesis

Algunos hongos endófitos aislados de las hojas de *Gliricidia sepium* (Fabaceae) constituyen una fuente de metabolitos secundarios, los cuales pueden inhibir directamente especies particulares de fitopatógenos, y ayudar así, a la defensa de la hospedera, a su sobrevivencia dentro de la planta, y constituir al mismo tiempo prototipos de agroquímicos o agentes de control biológico.

IV. Objetivos

1. Objetivos Generales

- Determinar el tipo de interacciones entre hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* y entre hongos endófitos y fitopatógenos *in vitro*, con el fin de establecer los mecanismos involucrados en estas relaciones, e inferirlos dentro de la comunidad fúngica en la planta, y por otro lado, en las interacciones contra hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura.
- Aislar y caracterizar algunos metabolitos secundarios con potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico producidos por el hongo endófito más competitivo aislado de *G. sepium* mediante el estudio químico biodirigido del extracto activo, y la identificación de compuestos orgánicos volátiles activos, con el fin de establecer los aspectos químicos involucrados en las relaciones hongo endófito-fitopatógeno, y el efecto fitotóxico de los compuestos que producen los hongos endófitos, contribuyendo así, con el desarrollo de nuevos agentes agroquímicos alternativos o de control biológico.

2. Objetivos particulares

- Recolectar el material vegetal en la 'Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla', y realizar el aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de plantas con potencial alelopático.
- Realizar bioensayos de antagonismo *in vitro* entre endófito-endófito, endófito-fitopatógeno de *G. sepium* y establecer el mecanismo de interacción interespecífica.
- Realizar bioensayos de antagonismo *in vitro* entre los hongos endófitos más competitivos y hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium*

ultimum y *Pythium polytylum*, estableciendo el mecanismo de interacción interespecífica.

- Identificar el género y, en lo posible, la especie del mayor número de hongos endófitos más competitivos y fitopatógenos aislados de *G. sepium*, mediante el análisis detallado de sus características macro y microscópicas.
- Corroborar la identificación de los hongos endófitos y fitopatógenos más antagónicos por medio de la secuenciación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal.
- Cultivar en pequeña escala algunos hongos endófitos de *G. sepium* con el mayor potencial antagónico contra hongos endófitos y fitopatógenos, estableciendo las mejores condiciones de cultivo. Obtener los extractos orgánicos del micelio y del medio de cultivo.
- Evaluar cuantitativamente el potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos, derivados de los cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos más competitivos aislados de *G. sepium*, sobre el crecimiento radial de fitopatógenos con importancia económica en la agricultura: dos hongos *F. oxysporum* y *A. solani*, y tres oomicetos *Ph. capsici*, *Ph. parasitica* y *P. aphanidermatum*, empleando el método de dilución en agar.
- Determinar cuantitativamente el potencial fitotóxico de los extractos orgánicos, derivados de los cultivos en pequeña escala de los hongos endófitos más competitivos aislados de *G. sepium*, sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*, utilizando el método dilución en agar.
- Seleccionar al menos un hongo endófito con potencial aleloquímico, y cultivarlo en mediana escala, verificando su potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico.
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de los extractos activos del hongo endófito con mayor potencial aleloquímico. Aislar y purificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica.

- Determinar cuantitativamente el potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados de las fracciones activas del hongo endófito con mayor potencial aleloquímico.
- Evaluar la producción de metabolitos secundarios del hongo endófito con mayor potencial aleloquímico en la zona más cercana al área donde se establece la interacción antagónica con un microorganismo fitopatógeno, *in vitro*, para establecer si hay un cambio en el metabolismo secundario.
- Identificar los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito con mayor potencial aleloquímico en diferentes días de crecimiento, y en interacción antagónica inter e intra específica, empleando microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar el potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico de los metabolitos secundarios volátiles producidos por el hongo endófito con mayor potencial aleloquímico sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X.

V. Materiales y Métodos

1. Recolección del material vegetal

La recolección se llevó a cabo en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH), en la estación biológica de la localidad de Quilamula en el municipio de Tlalquitenango (8°30'4.1"N - 98° 51'52"O' y 18°32'12.2"N - 99° 02'05"O 1080-1230 msnm), Morelos, en septiembre de 2010. Se recolectaron hojas sanas de la parte media de 11 plantas leñosas siguiendo el criterio de plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad aunado al criterio ecológico (Yu et al. 2010). Asimismo, se recolectaron hojas enfermas para el aislamiento de microorganismos fitopatógenos. En el Cuadro 3 se indica las plantas hospederas seleccionadas, señalando su uso etnobotánico o etnomédico, los metabolitos secundarios que producen y su actividad biológica. Cabe destacar que para las plantas elegidas no se ha encontrado información en la literatura acerca del aislamiento o identificación de sus hongos endófitos.

2. Aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos de hojas de plantas de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH)

2.1. Aislamiento de hongos endófitos

El material vegetal se lavó con agua purificada y agua destilada estéril. Posteriormente, se esterilizó superficialmente con etanol al 75% por 60 s y Clorox® al 65% (equivalente a 3.4% de NaClO) por 60 s, y se lavó con agua destilada estéril entre los tratamientos. Las hojas estériles se secaron con papel adsorbente estéril. A continuación, de la parte central se cortaron segmentos de 2 x 2 mm y se colocaron cuatro segmentos al azar en cajas Petri de 9 cm conteniendo medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), y cuatro de la misma hoja en Agar-Agua (AA) al 2%, ambos adicionados con antibiótico (cloranfenicol 500 mg/L). Se utilizaron 6 hojas de cada planta recolectada. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad natural (12:12 h) y cada colonia distinta que fue emergiendo de los segmentos de hojas se transfirió a cajas Petri con PDA (Rodrigues 1994; Schulz & Boyle 2005).

Cuadro 3. Plantas seleccionadas para el aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos

Planta	Nombre común	Uso	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Referencias
<i>Bursera linaloe</i> (Burseraceae)	Cacahuananche, cacahuate, caña dulce, toposote	Dolor de cabeza, picaduras de alacranes	Aceite esencial de hojas: linalol, geraniol, mirceno, entre otros	Aceite esencial con actividad antibacteriana contra <i>Rhodococcus equi</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx; Queiroga et al. 2007)
<i>Bursera lancifolia</i> (Burseraceae)	--		Volátiles del tallo: α -terpineol, terpinen-4-ol, α -tujeno, linalool y limoneno	--	(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx)
<i>Gliricidia sepium</i> (Fabaceae)	Mata rata, Guerrero, Guaje, Cola de alacrán, Cacahuano, Tecahuananche	Afecciones en la piel, como el sarampión, salpullido, sarna, ictericia; antipirético, en mordeduras de serpiente. Forraje, cerca viva	Tallo: 2-7-dihidroxi-3'-metoxi-isoflavano-3'-4'-7' trihidroxo-flavanona, gliricidina, gliricidol, isomucronulatol, robinetina, sepiol, sepiol, 2'-O-metil sepiol. Flor: astragalina, robinina y trifolina (flavonoides); el aceite esencial contiene 26 compuestos donde el mayoritario es una cumarina. Hojas: pinitol, el aceite esencial contiene 16 compuestos donde el mayoritario es el propilenglicol. Corteza: 19 compuestos en el aceite esencial, los mayoritarios son metil-3(E)-penteniléter, 3-metil-2-butanol y 3-metoxihexano.	Extractos con actividad insecticida contra <i>Spodoptera frugiperda</i> , antiinflamatoria y diurética en ratas, antiespasmódica en ileon de cobayo e hipotérmica en ratones. Aceite esencial con actividad antimicrobiana contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacter faecalis</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Serratia marcescens</i>	(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx; Montes-Molina et al. 2008; Reddy and Jose 2010; Kaniampady and Arif 2007)

-- No se encontró información acerca de la planta.

Cuadro 3. Plantas seleccionadas para el aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos (Continuación)

Planta	Nombre común	Uso	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Referencias
<i>Leucaena macrophyla</i> (Fabaceae)	--	Forraje	Tallos y hojas: mimosina, taninos	Taninos antialimentarios (astringentes). Mimosina: tóxica para rumiantes	(García et al. 2008)
<i>Haematoxylon brasiletto</i> (Fabaceae)	Azulillo, brasil, campeche, corteza de Brasil, palo Brasil, palo de tinta, palo tinto	En padecimientos del sistema cardiovascular, debilidad causada por anemia, males renales y úlceras gástricas	Tallo: brasilín, hematoxilin, ácido cafeico, galato de metilo, ácido gálico, floroglucinol, ácido 4-hidroxi-cinámico, 5-metoxi-psoraleno	Compuestos con actividad antibacteriana y contra bacterias patógenas de humano.	(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx; Rivero-Cruz 2008)
<i>Piper leucophyllum</i> (Piperaceae)	Cordoncillo, Hoja santa	--	--	--	(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx)
<i>Salvia</i> sp. (Labiatae)	--	Dolor de estómago, disentería, diarrea, dolor de cabeza	Algunos metabolitos son: β -sitosterol, uvaol, ácidos oleanólico y ursólico, salviacoccina, Las flores contienen flavonoides derivados de cianidina, derivados glucosilados de la pelargonidina	Extractos y diterpenos tipo abietano de <i>Salvia barrelier</i> , con propiedades antioxidantes. Extractos de <i>Salvia miltiorrhiza</i> con propiedades antioxidantes y citotóxicas. Extractos de <i>Salvia moorcraftiana</i> con actividad antifúngica.	(www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx; Orhan et al. 2013; Don et al. 2006; Khan et al. 2002; Kolak et al. 2009)

-- No se encontró información acerca de la planta.

Cuadro 3. Plantas seleccionadas para el aislamiento de hongos endófitos y fitopatógenos (Continuación)

Planta	Nombre común	Uso	Metabolitos secundarios	Actividad biológica	Referencias
<i>Sapium macrocarpum</i> (Euphorbiaceae)	Palo verde, hincha huevos, venellino, lechón	Picaduras de escorpiones, antipirético, en verrugas (látex)	--	Extractos con actividad antioxidante e insecticida contra <i>S. frugiperda</i>	(Ruiz-Terán et al. 2008)
<i>Lysiloma acapulcense</i> (Fabaceae)	Tepehuaje	Contra la diarrea, heridas y ampollas	Corteza: taninos del estero, β - sitosterol	Extracto con actividad molusquicida	(www.medicinatradicionalm exicana.unam.mx)
<i>Hipocratea acapulcensis</i> (Celastraceae)	--	--	--	--	--
<i>Mimosa affinis</i> (Fabaceae)	--	--	--	--	--

-- No se encontró información acerca de la planta.

2.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos

Las hojas dañadas o con manchas se lavaron con agua destilada estéril y se esterilizaron superficialmente con Clorox® al 38% (equivalente a 2% de NaClO) por 60 s, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en cámaras húmedas (cajas Petri con algodón y papel filtro estériles con 30 mL de agua destilada estéril). Se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad naturales 12:12 h. Las colonias que emergieron se transfirieron a cajas de Petri con PDA adicionadas con cloranfenicol (500 mg/L) (Rodrigues 1994; Agrios 2005).

2.3. Purificación y conservación de hongos endófitos y fitopatógenos

Los hongos aislados se resembraron en PDA con o sin antibiótico hasta obtener las colonias puras. Las colonias fúngicas se conservaron en tubos inclinados con PDA a temperatura ambiente y en tubos con AA al 0.2% a 4 °C en el Laboratorio 1-4 en el Instituto de Química, UNAM. Los hongos con mayor actividad biológica se conservaron en Caldo-Papa-Dextrosa (CPD) con glicerol al 30% a – 80 °C en el Laboratorio de Micromicetos y Levaduras en el Instituto de Biología, UNAM. Además, el hongo endófito más competitivo, aislado de *G. sepium*, se conservó en PDA y en agar avena (OA) en el Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, donde se registró con un número de colección MEXU.

3. Determinación de la tasa de crecimiento, características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Gliricidia sepium*

Los hongos endófitos y fitopatógenos puros se sembraron por triplicado en cajas de Petri con PDA, utilizando inóculos de 5 mm de diámetro. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad naturales 12:12 h. El crecimiento de los microorganismos se obtuvo mediante el registro del área del micelio en un acetato tomada cada dos días, hasta que el crecimiento del microorganismo llegó al límite de las cajas. El cálculo del área se obtuvo utilizando el programa ImageJ 1.44 p. Las curvas de crecimiento se construyeron graficando el área en cm² vs tiempo en días; donde la pendiente indica la tasa de crecimiento. La tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos se clasificó arbitrariamente como crecimiento muy lento, lento, medio, rápido y muy rápido.

Las características macroscópicas del micelio se registraron cada dos días con ayuda de un microscopio estereoscópico (Motic 102M). Registrando su textura, consistencia, superficie, color del micelio en su cara superior e inferior, tipo de crecimiento, producción de exudado y la difusión de metabolitos secundarios coloridos en el medio de cultivo (Leslie & Summerell 2006). De acuerdo con estas características, los hongos se agruparon por morfotipos.

Las características microscópicas de los hongos se registraron mediante la obtención y el análisis de preparaciones microscópicas del micelio fresco. Los hongos se cultivaron en distintas condiciones para promover la formación de esporas. Las preparaciones microscópicas se realizaron por impronta del micelio con cinta Scotch® o con aguja de disección, y se tiñeron con rojo Congo o azul de lactofenol. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (MOTIC® modelo BA410) con los objetivos de 40 y 100X y se tomaron diversas fotografías con la cámara MOTICAM® 2000, registrándose, las características de las hifas y formación de estructuras de reproducción sexuales o asexuales (Leslie & Summerell 2006).

4. Bioensayos de antagonismo directo

Para seleccionar los hongos endófitos con el mayor potencial antagónico, los microorganismos se enfrentaron *in vitro* en diferentes combinaciones: entre endófitos aislados de *G. sepium*; entre endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium* y entre endófitos y fitopatógenos con importancia agrícola (Flores Reséndiz 2014).

4.1. Antagonismos directos simples entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos aislados de *G. sepium*

Los hongos endófitos se antagonizaron de acuerdo a los siete grupos establecidos con base en su tasa de crecimiento y a su morfotipo establecido de acuerdo con sus características macroscópicas. Los bioensayos se realizaron entre:

- hongos de crecimiento muy lento y lento de morfotipo blanco
- hongos de crecimiento muy lento de diferentes morfotipos

- hongos de crecimiento muy lento de diferentes morfotipos
- hongos de crecimiento muy lento de morfotipo blanco en el anverso y café en el reverso
- hongos de crecimiento medio de diferentes morfotipos
- hongos de crecimiento medio de diferentes morfotipos
- hongos de crecimiento rápido de morfotipo verde grisáceo

Los microorganismos se inocularon de acuerdo a sus tasas de crecimiento en cajas de Petri estériles de 9 cm que contenían 15 mL de PDA. Cada microorganismo competidor se sembró utilizando inóculos de 5 mm de diámetro de colonias cultivadas previamente en PDA durante 10 días. Los inóculos se colocaron equidistantes ocupando sólo un extremo de la caja de Petri como se muestra en la Figura 2. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad naturales (12:12 h). Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones bajo una campana de flujo unidireccional. Paralelamente, se desarrollaron controles de crecimiento.

Los resultados de crecimiento e interacción macroscópica entre los competidores se registraron e interpretaron: 1) a los 7 días de interacción antagónica; 2) cuando las colonias entraron en contacto, y 3) después de hacer contacto: a los 7, 14 y 21 días de interacción antagónicas. En cada caso se midieron los radios a y b (Figura 2) de los microorganismos competidores y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de acuerdo con la siguiente fórmula: $|a-b/b| \times 100$, donde a y b son los radios de los diferentes competidores. Adicionalmente, se fotografiaron los bioensayos de antagonismo a los distintos tiempos de interacción (Shearer 1995; Yuen et al. 1999; Macías-Rubalcava et al. 2008; Flores Reséndiz 2014).

El tipo de interacción entre los hongos endófitos y los competidores se obtuvo de acuerdo con los valores numéricos señalados en el Cuadro 4. Una vez asignado un valor se calculó el índice de antagonismo de la siguiente manera:

$$IA = B1 (n \times 1) + B2 (n \times 1) + C (n \times 2) + D (n \times 3) + E1 (n \times 4) + E2 (n \times 4)$$

Donde n es el número de veces que el hongo presentó la categoría de antagonismo correspondiente (A, B1, B2, C, D, E1 o E2) (Yuen et al. 1999).

Los hongos más antagónicos de cada grupo se volvieron a enfrentar entre sí de acuerdo a sus tasas de crecimiento, y se determinó el tipo de interacción, el porcentaje de inhibición, y su IA.

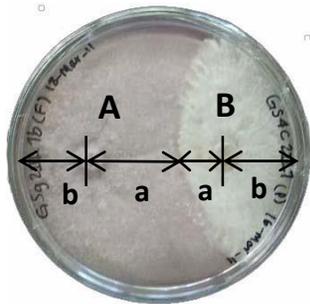
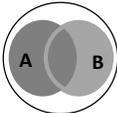
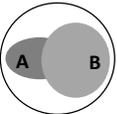
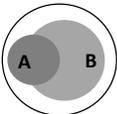
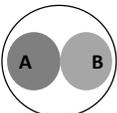
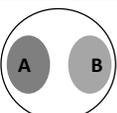
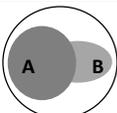
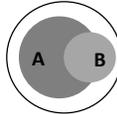


Figura 2. Bioensayo de antagonismo en caja de Petri entre dos hongos (A y B). a y b representan los radios de cada microorganismo.

Cuadro 4. Tipo de interacciones entre microorganismos y valores numéricos asignados

Categorías	Tipos de interacción		Puntos
A		El crecimiento de A se entremezcla con el de B, sin que exista reducción en el crecimiento de alguna de ellas	0
B1		La especie B crece encima de la especie A reduciendo el crecimiento de A	1
B2		La especie B crece hasta y alrededor de la especie A	1
C		La especie A crece casi en contacto con B y cesa el crecimiento de ambas especies	2
D		Las especies A y B se inhiben a distancia	3
E1		La especie A crece encima de la especie B reduciendo el crecimiento de B	4
E2		La especie A crece hasta y alrededor de la especie B	4

4.2. Antagonismos directos simples entre hongos endófitos y microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola

Los hongos endófitos que mostraron el mayor potencial antagónico en los bioensayos de antagonismo entre endófito-endófito se enfrentaron de nueva cuenta contra hongos y oomicetos con importancia económica en la agricultura. Los hongos utilizados fueron *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*, y los oomicetos, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Pythium aphanidermatum*. Los microorganismos fitopatógenos de prueba fueron proporcionados por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Los antagonismos se realizaron de acuerdo con su tasa de crecimiento, y de la manera descrita en la sección 4.1. Los bioensayos se realizaron por cuadruplicado con sus respectivos controles de crecimiento. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó a los 4, 8, 11 y 22 días de interacción (Macías-Rubalcava et al. 2008; Flores Reséndiz 2014).

4.3. Antagonismos entre el endófito antagónico *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola

4.3.1. Antagonismo directo simple

Los bioensayos de antagonismo directo simple entre el hongo endófito antagónico *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola se llevaron a cabo con los hongos *F. oxysporum* y *A. solani*, y los oomicetos fitopatógenos *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora palmivora*, *Ph. capsici*, *Ph. parasitica*, *Pythium polytylum*, *Pythium ultimum* y *P. aphanidermatum*. Los microorganismos fitopatógenos de prueba fueron proporcionados por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Los bioensayos se realizaron empleando cajas de Petri estériles de 9 cm que contenían 15 mL de PDA. Los microorganismos fitopatógenos competidores se inocularon a los tres días de crecimiento de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad naturales 12:12 h. Los bioensayos se realizaron por cuadruplicado, desarrollando paralelamente controles de crecimiento. El porcentaje de

inhibición del crecimiento se calculó a los 4, 8, 11 y 22 días de interacción (Macías-Rubalcava et al. 2008). El resultado de las interacciones se determinó después de 22 días de acuerdo con las categorías establecidas por Yuen y colaboradores (1999), y se calculó el índice de antagonismo (Yuen et al. 1999), de manera adicional, se describieron las interacciones siguiendo el criterio de Rotheray y colaboradores (Rotheray et al. 2011). Con base en este criterio, los resultados de las interacciones pueden ser: 1) inhibición a distancia, donde los micelios de los competidores no se encuentran; 2) reemplazo parcial, donde un hongo crece sobre su competidor, pero el micelio nunca alcanza el lado opuesto de la placa; 3) reemplazo, donde un hongo crece completamente sobre su competidor.

Por último, se confirmó si *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a puede eliminar a los microorganismos fitopatógenos competidores, evaluando la recuperación de éstos, a los 22 días de interacción antagónica, mediante la transferencia de un inóculo de la zona de interacción con *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a una nueva placa de Petri con PDA e incubando de nuevo bajo las condiciones señaladas anteriormente. El crecimiento de los fitopatógenos competidores, de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a o de ambos microorganismos se observó después de 8 días de incubación (Macías-Rubalcava et al. 2008).

4.3.2. Antagonismo directo múltiple

Los bioensayos de antagonismo directo múltiple se realizaron utilizando cajas de Petri de 15 cm, conteniendo 40 mL de PDA. El endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se inoculó antes que sus competidores fitopatógenos, colocando cuatro inóculos equidistantes en el centro de las cajas (Figura 3). *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se cultivó a 28 °C durante 3 (Nod3), 5 (Nod5), 7 y 9 días. Trascurrido cada tiempo de incubación, se inocularon los oomicetos y los hongos fitopatógenos de importancia agrícola alrededor del endófito y en la orilla de la caja de Petri, y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Los microorganismos competidores fueron los oomicetos fitopatógenos *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. polytylum*, *Ph. capsici*, *Ph. palmivora*, *Ph. cinnamomi*, *Ph. parasitica*, y los hongos *F. oxysporum* y *A. solani*. Los microorganismos fitopatógenos de prueba fueron proporcionados por el Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

El resultado de las interacciones y el porcentaje de inhibición se determinaron a los 2, 4, 6 y 8 días de interacción antagónica. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la medición del radio de cada micelio y se comparó con los controles de crecimiento que se desarrollaron paralelamente. El experimento se realizó por triplicado bajo una campana de flujo unidireccional.

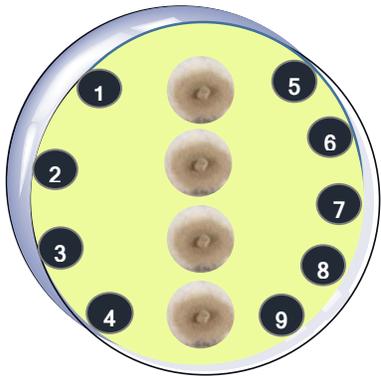


Figura 3. Esquema del bioensayo de antagonismo directo múltiple entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los microorganismos fitopatógenos: 1) *Phytophthora palmivora*, 2) *Pythium aphanidermatum*, 3) *Alternaria solani*, 4) *Phytophthora parasitica*, 5) *Fusarium oxysporum*, 6) *Pythium ultimum*, 7) *Phytophthora capsici*, 8) *Pythium polytylum* y 9) *Phytophthora cinnamomi*.

Los datos de porcentaje de inhibición de los antagonismos simples y múltiples se analizaron mediante un análisis de t-student de dos colas ($\alpha=0.05$), utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01 (Sandoval-Espinosa 2014).

5. Identificación de los hongos endófitos más antagónicos

La identificación de los hongos endófitos de *G. sepium* con mayor potencial antagónico se realizó con base en el análisis detallado de sus características macroscópicas y microscópicas, y mediante la aplicación de técnicas de biología molecular.

La caracterización morfológica del aislamiento GSE27 o GS4d2II1a (clave inicial) fue realizada en primera instancia con base en la descripción de la colonia en PDA y OA, de acuerdo a los protocolos de Ellis (1971) y Ju & Rogers (1996). Las estructuras anamórficas fueron observadas y medidas utilizando microscopía óptica. El color de la colonia y pigmentos fueron establecidos empleando el manual de colores Methuen (Kornerup & Wanscher 1967).

La confirmación de la identidad del hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se llevó a cabo por métodos de biología molecular, mediante la secuenciación de la región 5.8S DNA ribosomal

y de dos regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1, ITS2), en colaboración con el Dr. Sergio Sánchez Esquivel, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a se cultivó por 5 días en CPD a 29 °C, incubando con agitación orbital a 180 rpm, siguiendo el protocolo modificado por Akins y Lambowitz (1985). El DNA genómico se extrajo por el método con fenol-cloroformo y alcohol isoamílico a partir de micelio obtenido en su etapa de crecimiento exponencial y se purificó (Espinosa Gómez 2012). El DNA se amplificó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la enzima Taq Polimerasa (Invitrogen) y los oligonucleótidos ITS1-F Fwd (5'-CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA-3') (Gardes & Bruns 1993) y ITS4-A Rev (5'-CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG-3') (Larena et al. 1999). La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 µL de reacción conteniendo 5 µL 1x del Buffer 10x, 1.25 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 25 pM de cada oligonucleótido, 2 µL de DNA (150 ng/µL) y 1 U Taq polimerasa (Invitrogen). La amplificación se realizó durante 30 ciclos (94 °C por 1 min, 52 °C por 45 seg, 68 °C por 1 min) con un precalentamiento de 94 °C por 1 min, y una reamplificación a 68 °C por 10 min. El producto de PCR se purificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 1X, a 90 V, durante 40 min, y se visualizó bajo un transiluminador UV. Finalmente, se envió a la empresa Laragen Incorporated (Utah, USA) para su secuenciación. La alineación y edición de la secuencia se realizó con el programa BioEditProgram v 7.0.530. La secuencia editada se alineó en la base de datos GenBank utilizando el programa BlastN (Altschul et al. 1990), y se depositó.

Las secuencias de ITS-5.8S con un valor de identidad alto (>95%) depositadas previamente en el GenBank se descargaron y se realizó la construcción de un árbol filogenético con un análisis de Neighbor-Joining, utilizando el programa Mega 6 (Tamura et al. 2013), en colaboración con la Dra. Patricia Lappe Oliveras, del Instituto Biología, UNAM.

La identificación de los demás hongos endófitos de *G. sepium* con alto potencial antagónico, se realizó en colaboración con la Dra. Patricia Lappe Oliveras. Para el análisis de las secuencias ITS5 y ITS4, el DNA genómico total se extrajo a partir del micelio recolectado de cultivos en caja de Petri de 7 días en medio PDA, empleando el kit rápido de aislamiento de DNA genómico de hongos FT71415 (Bio Basic Inc). La región ITS-5.8S se amplificó con los oligonucleótidos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). La reacción de PCR se realizó en un termociclador Thermal Gernandt 2720 (Applied Biosystems), en un volumen de reacción de 50 µL que contiene 25 µL GoTaq® Master Mix (Promega), 2.5 µL de cada oligonucleótido (10 pm/µL) y 5 ng de DNA genómico. El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, seguida por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 58 °C, 1 min a 72 °C, y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) (Invitrogen) teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) en buffer 1X TAE, a 90 V, durante 40 min, y se visualizó bajo un transiluminador UVP Dual-Intensity (Upland, CA, EE.UU.). Las secuencias fueron obtenidas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM, y posteriormente, se editaron utilizando el programa BioEdit v 7.0.5 (Hall 2005). Las secuencias editadas se alinearon en la base de datos GenBank usando el programa BLASTN (Altschul et al. 1990) y se compararon.

6. Cultivo en pequeña escala de hongos endófitos

Las mejores condiciones de crecimiento de los hongos endófitos más antagónicos aislados de *G. sepium*, se establecieron mediante su incubación en cultivos líquidos empleando CPD e incubado los microorganismos bajo condiciones estáticas y con agitación. Además, se obtuvieron cultivos sólidos en PDA y en medio Arroz (MA).

Los cultivos estáticos se realizaron utilizando matraces Fernbach de 2.8 L con 1 L de CPD y se incubaron de 2-4 meses, dependiendo de la tasa de crecimiento del hongo. Para los cultivos en condiciones de agitación se utilizaron matraces Erlenmeyer de 2 L, conteniendo 1.3 L de CPD, e incubándolos por 3 semanas a 150 rpm. Los inóculos se tomaron de colonias de 10 días de cultivo en PDA de los hongos endófitos puros, y consistieron en cinco cortes del micelio de 1 cm² (Macías-Rubalcava et al. 2014a; Meléndez-González et al. 2015). Los cultivos sólidos de algunos hongos endófitos se realizaron utilizando cinco cajas Petri de 15 cm con 50 mL de PDA, y en matraces Fernbach de 2.8 L conteniendo 300 g de arroz para el medio MA. Todos los cultivos se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz-oscuridad natural 12:12 h.

6.1. Cultivos en pequeña escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en interacción con *Pythium aphanidermatum*

Con el fin de extraer e identificar el pigmento amarillo producido por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en interacción antagónica con *P. aphanidermatum*, observado en los bioensayos de antagonismo directo, se realizó el cultivo sólido en condición de antagonismo empleando MA y PDA. El cultivo en MA se realizó en matraces Fernbach de 2.8 L conteniendo 300 g de arroz. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se cultivó en interacción con *P. aphanidermatum* durante tres semanas. De manera paralela, se obtuvieron cultivos control, uno del hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y otro del fitopatógeno *P. aphanidermatum*. El cultivo en antagonismo en PDA se realizó en 5 cajas de Petri de 15 cm conteniendo 50 mL de medio de cultivo, manteniendo a los microorganismos en interacción por tres semanas, desarrollando sus respectivos controles de crecimiento.

Por otra parte, se realizaron tinciones del micelio en las zonas de antagonismo observadas para verificar si hubieron interacciones hifales (Shearer 1995; Yuen et al. 1999).

7. Obtención de extractos orgánicos

Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizaron preparaciones microscópicas para verificar la pureza de los cultivos. Posteriormente en el caso de los cultivos en medio CPD se separó el medio de cultivo del micelio mediante filtración simple utilizando gasa y papel filtro. Los extractos del micelio y de los cultivos sólidos se obtuvieron mediante un proceso de maceración exhaustivo, y los de medio de cultivo por extracción con Amberlita® XAD-16 o por partición, de acuerdo con la metodología que se indica a continuación:

- Maceración con CH₂Cl₂ y AcOEt

El micelio húmedo y los cultivos sólidos se maceró con CH₂Cl₂ (500 mL x 5) e inmediatamente después con AcOEt (500 mL x 5).

- Extracción con Amberlita® XAD-16 (Rohm y Haas)

Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron añadiendo 100 g de Amberlita XAD-16 al medio y se agitaron a 200 rpm durante 12 h. Posteriormente, se decantó el medio de cultivo y los compuestos adheridos a la resina se removieron por extracción con metanol (500 mL

x 3) agitando a 200 rpm por 2-3 h y se filtraron. Las resinas se lavaron perfectamente antes de usarse nuevamente (Baker et al. 2009).

- Reparto con CH₂Cl₂ y AcOEt

Se realizaron repartos sucesivos empleando CH₂Cl₂ (500 mL x 3) y AcOEt (500 mL x 3) como disolventes de extracción.

En todos los casos la fase orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío con un rotaevaporador. Los extractos del medio de cultivo y micelio de los distintos cultivos se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) para determinar su similitud cromatográfica. Los extractos con mayor similitud se unieron y se registró el rendimiento (Macías-Rubalcava et al. 2014a; Sandoval-Espinosa 2014).

De manera adicional, los extractos orgánicos derivados de los cultivos en MA se sometieron a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición entre hexano y metanol.

7.1. Obtención de extractos orgánicos de los cultivos en pequeña escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en interacción con *P. aphanidermatum*

Con el fin de verificar si hubo interacciones hifales en los cultivos en antagonismo en PDA, se realizaron preparaciones microscópicas del micelio en las zonas más cercanas a la interacción antagónica. Por otra parte, cada zona de los micelios crecidos en condiciones de antagonismo (zona de interacción, zona alejada de la interacción) y los controles de crecimiento se cortaron con espátula en pequeños segmentos, y se maceraron exhaustivamente utilizando CH₂Cl₂ como disolvente de extracción. Por otro lado, los cultivos en MA se maceraron exhaustivamente con CH₂Cl₂.

De nueva cuenta, los extractos orgánicos de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los obtenidos de la interacción *Nodulisporium* sp.-*P. aphanidermatum* en MA se sometieron a un proceso de partición hexano-metanol.

Los extractos orgánicos resultantes se concentraron al vacío por medio de un rotaevaporador y se analizaron por CCF para determinar si los perfiles cromatográficos de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cambian en interacción antagónica con *P. aphanidermatum*.

8. Evaluación del potencial antifúngico, antioomiceto y fitotóxico

La determinación cuantitativa de la actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los extractos orgánicos, fracciones cromatográficas y compuestos puros, se realizó por el método de dilución en agar utilizando cajas de Petri de 5 cm de diámetro (Macías-Rubalcava et al. 2014a; Meléndez-González et al. 2015).

8.1. Evaluación de la actividad antifúngica y antioomiceto

La determinación de la actividad antifúngica y antioomiceto se realizó evaluando el efecto de los tratamientos, sobre el crecimiento radial de cinco microorganismos fitopatógenos de prueba, dos hongos: *F. oxysporum* y *A. solani*, y tres oomicetos: *Ph. capsici*, *Ph. parasitica* y *P. aphanidermatum*, utilizando una concentración de prueba de 250 µg/mL para extractos, y de 200 µg/mL para compuestos puros. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de una disolución de la muestra a evaluar en PDA al 1%, y se dejaron solidificar por completo. Enseguida, se colocó en el centro de cada caja un inóculo de 0.5 cm de diámetro del microorganismo de prueba, previamente incubado en PDA por 10 días. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas se incubaron 1-5 días, dependiendo del microorganismo de prueba, a 28 °C con fotoperiodo luz fluorescente-oscuridad 12:12 h. Al término de la incubación, se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición, y de cada especie fitopatógena de prueba. El porcentaje de inhibición en cada caso se determinó con base en el crecimiento de los controles que se desarrollaron paralelamente. Como controles negativos se utilizaron PDA al 1% y PDA 1%-MeOH (0.1-0.3 mL) y como controles positivos Ridomil 4E[®] (Metalaxil-M) para oomicetos y Prozicar[®] (Carbendazim) para hongos, a una concentración de 250 µg/mL para extractos y 200 µg/mL para compuestos puros (Meléndez-González et al. 2015). De manera adicional, se realizaron preparaciones microscópicas de las colonias control y de las colonias en presencia de los compuestos puros, tiñendo con rojo congo, para determinar si hubo un cambio morfológico importante en las hifas de los micelios debido a la presencia de los metabolitos secundarios de prueba (Duan et al. 2013).

Los promedios de porcentajes de inhibición se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $\alpha = 0.05$ y una prueba de contrastes de Tukey HDS (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0) (Macías-Rubalcava et al. 2014a; Meléndez-González et al. 2015).

8.2. Evaluación de la actividad fitotóxica

La determinación del potencial fitotóxico se realizó mediante la evaluación del efecto de los tratamientos sobre la germinación y la longitud de la raíz de dos plantas modelo: *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto) y *Solanum lycopersicum* (jitomate). Las semillas de *A. hypochondriacus* se compraron en el mercado de Tulyehualco México, D.F. y las de *S. lycopersicum* se adquirieron en “semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, México.

Los bioensayos se realizaron empleando una concentración prueba de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para extractos y fracciones cromatográficas. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de una disolución del tratamiento a evaluar en AA al 1% y se dejaron solidificar. Para la evaluación de las fracciones no polares, el bioensayo se realizó en cajas de Petri con papel filtro. En cada caja se colocaron 5 mL de una disolución en hexano de la fracción a evaluar, y se dejó evaporar completamente el disolvente. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de agua destilada. Enseguida, se colocaron 10 semillas por caja, para ambas modalidades de bioensayo, y se incubaron en la oscuridad a 28 °C. Se evaluaron controles negativos de AA al 1%, AA al 1%-MeOH (0.1-0.3 mL) y hexano, y como control positivo se utilizó el herbicida comercial Rival® (Glifosato) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La longitud de las raíces se midió después de 24 h para las semillas de *A. hypochondriacus* y 72 h para las de *S. lycopersicum*, y se obtuvo el porcentaje de inhibición de la germinación y del crecimiento de la raíz (Macías-Rubalcava et al. 2014a).

El promedio de los porcentajes de inhibición se analizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $\alpha = 0.05$ y una prueba de contrastes de Tukey HDS (utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0) (Macías-Rubalcava et al. 2014a).

8.3. Evaluación de la actividad antifúngica y fitotóxica de compuestos volátiles de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

La actividad biológica de los de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se realizó en bioensayos de antagonismo utilizando cajas de Petri divididas de 9 cm. La actividad de los VOCs se evaluó a diferentes tiempos de crecimiento de *Nodulisporium* sp., empleando 10 microorganismos fitopatógenos con importancia económica y dos plantas de prueba.

Los microorganismos de prueba fueron: *F. oxysporum*, *A. solani*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. polytylum*, *Ph. capsici*, *Ph. parasitica*, *Ph. palmivora*, *Ph. cinnamomi* y *Phytophthora cactorum*. Todos los microorganismos blanco se inocularon a los 0, 3, 5, 7 y 13 días de crecimiento de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en cajas de Petri divididas con PDA. El porcentaje de inhibición se determinó midiendo el diámetro de las colonias en diferentes días de incubación dependiendo del fitopatógeno de prueba (inciso 8.1) (Macías-Rubalcava et al. 2010).

El efecto fitotóxico de los VOCs se estableció sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*. El bioensayo se llevó a cabo en cajas de Petri divididas, conteniendo en un compartimiento 10 mL de PDA al 1%, y en el otro, 10 mL de AA al 1%. En el compartimiento con PDA se inoculó e incubó durante 5 y 8 días *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Trascurrido el tiempo de incubación se colocaron 20 semillas de *A. hypochondriacus* o de *S. lycopersicum* en el compartimiento con AA. Paralelamente, se desarrollaron controles de crecimiento. El porcentaje de inhibición de la germinación y del crecimiento de la raíz se obtuvo como se indicó en el inciso 8.2 (Macías-Rubalcava et al. 2010).

Los bioensayos de actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una $\alpha = 0.01$ y 0.05 , y una prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.03 (Macías-Rubalcava et al. 2014a).

9. Cultivo en mediana escala

9.1. Cultivo en CPD

El cultivo en mediana escala del endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se realizó en condiciones estáticas utilizando 7 garrafones de vidrio con capacidad de 18 L, y como medio de cultivo CPD. A cada garrafón se le adicionaron 5 L de CPD y se inocularon con cinco cortes de 1 cm² del micelio de *Nodulisporium* sp., previamente incubado por 8 días en PDA. Los cultivos se incubaron estáticamente a temperatura ambiente durante 1.5 meses, con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h (Sánchez Fernández 2010). Al término de la incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio empleando un proceso de partición con CH₂Cl₂ y de maceración exhaustivo con CH₂Cl₂ y AcOEt, respectivamente.

9.2. Cultivo en medio arroz

Por otra parte, con el fin de obtener cantidades adicionales de extracto activo y purificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica, se realizó otro cultivo en mediana escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a utilizando MA, usando 4 matraces Fernbach 2.8 L, conteniendo 300 g de arroz. Los matraces se incubaron por siete semanas con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12-12 h a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación se obtuvo el extracto orgánico por maceración exhaustiva empleando CH₂Cl₂ y AcOEt como disolventes de extracción y, posteriormente, se sometieron a un fraccionamiento primario mediante un proceso de partición entre hexano y metanol. Los extractos orgánicos se compararon por CCF.

Por último, se verificó el potencial antifúngico y fitotóxico, de ambas condiciones de cultivo, siguiendo los procedimientos experimentales descritos previamente.

10. Estudio químico

10.1. Métodos cromatográficos generales

El extracto orgánico del medio de cultivo en mediana escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, se fraccionó mediante cromatografía de adsorción en columna abierta (CC), empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.20 mm, malla 70-230) y diferentes sistemas de elución de polaridad creciente (Hex-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, y CH₂Cl₂-MeOH). Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck de 0.25 mm de espesor), y varios sistemas de eluyentes (Hex-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, y CH₂Cl₂-MeOH en diversas proporciones) y como agentes cromogénicos se emplearon sulfato cérico (12.0 g sulfato cérico, 22.2 mL ácido sulfúrico concentrado y 350.0 g hielo) y ácido sulfúrico al 10%. Para obtener el desarrollo del color se calentó cada cromatoplaqueta por dos minutos aproximadamente a 90 °C (Sandoval-Espinosa 2014). La purificación por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 mm de espesor) aplicando en cada cromatoplaqueta aproximadamente 10 mg de muestra.

10.2. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto del medio de cultivo en mediana escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

El fraccionamiento primario del extracto de CH₂Cl₂ (3.742 g) derivado del medio de cultivo obtenido del cultivo en mediana escala en CPD del hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, se realizó por CC. Se utilizaron 191.9 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 227 fracciones de 75 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 12 fracciones primarias. En el Cuadro 5 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario del extracto del medio de cultivo de mediana escala

Fracción (Fx)	Fracciones	Sistema de elución	Proporción	Peso (mg)
1	1-38	Hex Hex - CH ₂ Cl ₂ Hex - CH ₂ Cl ₂	100 90:10 80:20	54.0
2**	39-56	Hex - CH ₂ Cl ₂ Hex - CH ₂ Cl ₂	70:30 60:40	28.6
3	57-65	Hex - CH ₂ Cl ₂ Hex - CH ₂ Cl ₂	60:40 1:1	43.6
4**	66-130	Hex - CH ₂ Cl ₂ Hex - CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ - MeOH	1:1 40:60 30:70 20:80 10:90 100 99:1	283.9
5**	131-142	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH	99:1 98:2	272.2
6**	143-151	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH	98:2 97:3	321.4
7**	152-159	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH	97:3 96:4	463.2
8**	160-172	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH	96:4 95:5	203.2
9**	173-179	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH	95:5 90:10	115.4
10**	180-187	CH ₂ Cl ₂ - MeOH	90:10	318.6
11**	188-196	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH	90:10 80:20	508.0
12	197-227	CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH CH ₂ Cl ₂ - MeOH MeOH	80:20 70:30 60:40 1:1 100	895.1

** Fracciones activas sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*.

10.3. Aislamiento, purificación e identificación de las isobenzofuranonas **28-31** de la fracción primaria **4**

A partir de la fracción primaria **4** precipitó espontáneamente un sólido cristalino. El análisis por CCF demostró que era una mezcla constituida por cuatro compuestos mayoritarios (**28-31**). La separación y purificación de los constituyentes se realizó por medio de sucesivas CCFP y por recristalizaciones sucesivas.

10.3.1. Obtención de la 7-Hidroxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**28**), 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**), 6-formil-4-metil-7-metoxi-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**30**) y 7-metoxi-6-metil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**31**)

La isobenzofuranona **28** precipitó como un sólido cristalino de la fracción **4** y se purificó por recristalizaciones sucesivas con hexano, lo que permitió tener un monocristal para su elucidación estructural por difracción de rayos X.

Asimismo, sucesivas CCFP de la fracción **4** utilizando el sistema de elución Hex-CH₂Cl₂-MeOH (98:1:1), y procesando las cromatoplasmas de la manera habitual, permitieron obtener 2 mg de la isobenzofuranona **28**. Además, sucesivas CCFP de esta fracción utilizando el sistema de elución Hex-AcOEt (7:3, x2), permitieron obtener 3.6 mg de la isobenzofuranona **29**, 4.1 mg de la isobenzofuranona **30** y 11.3 mg (322.8 µg/L) de la isobenzofuranona **31**.

Por otra parte, se realizó el fraccionamiento secundario de las aguas madres de la fracción activa **4** (180.6 mg) por CC utilizando 34.1 g de gel de sílice, obteniéndose un total de 194 fracciones de 12 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 11 fracciones secundarias (4-I-4-XI). En el Cuadro 6 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

De la fracción secundaria 4-V se realizaron sucesivas CCFP usando el sistema de elución Hex-CH₂Cl₂-MeOH (98:1:1), obteniéndose 1.5 mg adicionales de la isobenzofuranona **28**. Además, de la fracción secundaria 4-VI se purificaron 1.1 mg del compuesto **28** por CCFP empleando el sistema de elución Hex-CH₂Cl₂ (3:7). En total se obtuvieron 4.6 mg (131.4 µg/L) de la 7-hidroxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**28**).

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 4

Fracción (Fx)	Fracciones	Sistema de elución	Proporción	Peso (mg)
4-I	1-53	Hex Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂	100 99:1 98:2 97:3	9.2
4-II	54-88	Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂	97:3 96:4 90:10 80:20 70:30	16.5
4-III	89-99	Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂	70:30 60:40	19.5
4-IV	100-101	Hex- CH ₂ Cl ₂	50:50	20.2
4-V	102-112	Hex- CH ₂ Cl ₂	50:50	16.4
4-VI	113-136	Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂	50:50 40:60 30:70 20:80	11.4
4-VII	137-145	Hex- CH ₂ Cl ₂ Hex- CH ₂ Cl ₂	20:80 10:90	4.5
4-VIII	146-159	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH	100 99:1 98:2	8.3
4-IX	160-167	CH ₂ Cl ₂ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH	98:2 97:3	3.8
4-X	168-174	CH ₂ Cl ₂ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH	97:3 96:4	35.6
4-XI	175-194	CH ₂ Cl ₂ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH CH ₂ Cl ₂ – MeOH MeOH	96:4 95:5 9:1 50:50 100	32.4

A partir de las fracciones secundarias 4-VII-4-VIII se purificó la isobenzofuranona **29**, utilizando sucesivas CCFP y como sistema de elución Hex-AcOEt (7:3). Después de procesar las cromatoplasmas de manera habitual se obtuvieron 1.8 mg adicionales. En total se obtuvieron 5.0 mg (142.8 µg/L) de la 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**).

La isobenzofuranona **30** se purificó a partir de las fracciones secundarias 4-VIII y 4-IX, mediante sucesivas CCFP, empleando de nueva cuenta una mezcla de Hex-AcOEt (7:3) como sistema de elución. Este procedimiento experimental permitió obtener 1.9 mg. En total se obtuvieron 6.0 mg (171.4 µg/L) de la 6-formil-4-metil-7-metoxi-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**30**).

10.4. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 28-31

Los espectros de resonancia nuclear magnética de protón (RMN- ¹H) y de carbono-13 (RMN- ¹³C) se realizaron en un aparato Bruker Avance III a una frecuencia de 400 y 125 MHz, respectivamente. Los espectros se generaron en CDCl₃, usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masa se obtuvieron en la modalidad de impacto electrónico (IE) con un aparato JOEL GCmate, para el compuesto **28**, y con el aparato JEOL JMS-AX505 HA, para los compuestos **29**, **30** y **31**. La muestra se introdujo por sonda de inyección directa. El análisis de rayos X del compuesto **28** se realizó en un difractómetro Siemens P4/PC. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron usando un espectrofotómetro Bruker-Alpha ATR.

11. Identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

11.1. Identificación de VOCs de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

La identificación de los VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en diferentes días de crecimiento y en interacción antagónica intra e interespecífica con el oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*, se llevó a cabo por microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) seguida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los microorganismos se cultivaron por triplicado en viales SPME de 40 mL de capacidad, conteniendo 15 mL de PDA, bajo las siguientes condiciones: 1) *Nodulisporium*

sp. aislamiento GS4d2II1a de tres días de crecimiento (Nod3), 2) *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a de cinco días de crecimiento (Nod5), 3) *P. aphanidermatum* de dos días de crecimiento, 4) interacción antagónica intraespecíficas de cinco días de crecimiento con dos inóculos de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, colocados a 2 cm de distancia (Nod-Nod), y 5) interacción interespecífica de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a con *P. aphanidermatum* (Nod-Pyt). La interacción interespecífica se llevó a cabo colocando un inóculo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en un vial de SPME y, después de tres días de incubación, se colocó a 2 cm de distancia un inóculo de *P. aphanidermatum*. El análisis de volátiles de Nod-Pyt se realizó después de dos días de interacción antagónica. El tamaño de los inóculos para todas las muestras fue de 5 mm, los cuales se tomaron de un cultivo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a de tres días de crecimiento y un cultivo de un día de crecimiento de *P. aphanidermatum*, ambos en PDA. Todos los tratamientos se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h.

Los metabolitos volátiles se extrajeron exponiendo una fibra de Divinilbenceno-Polidimetilsiloxano-Carboxen (DVB-PDMS-Carboxen, 2 cm, 50/30 mm) arriba de la muestra (fase de vapor; HS, por sus siglas en inglés) por 60 min. La fibra se acondicionó previamente durante 40 minutos a 250 °C. Los metabolitos volátiles retenidos se inyectaron a 300 °C a un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N en modo splitless. El tiempo de desorción fue de 2 min, y los compuestos desorbidos se separaron en una columna capilar DB-5MS (5% Fenilmetilsilicón, 10 m x 0.18 mm x 0.18 m) usando el siguiente programa de temperatura del horno del CG: temperatura del horno inicial de 40 °C por 3 min y calentamiento de 20 °C por min hasta alcanzar una temperatura final de 300°C, con un tiempo final de 5 min. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El CG se acopló a un detector selectivo de masas Leco TOF. Las condiciones del espectrómetro fueron: energía de ionización electrónica de 70 eV, rango de escaneo de 33-500 uma, velocidad de lectura de 20 espectros/s, temperatura de la cámara de ionización de 200 °C y temperatura de la línea de transferencia de 250 °C. La adquisición y procesamiento de datos se realizaron con el sistema de software LECO ChromaTOF™.

Los compuestos volátiles se identificaron con base en los patrones de fragmentación de los espectros de masas y sus índices de Kovats, los cuales se calcularon en relación con los

tiempos de retención de una serie de alcanos (C₈-C₂₀). Ambos se compararon con los datos de los compuestos químicos compilados por Adams (2007), las bases de datos del NIST y la Pherobase. Además, se comparó el espectro de masas y el índice de Kovats de algunos compuestos con los obtenidos con estándares auténticos (Sigma-Aldrich ≥98% pureza) bajo las mismas condiciones de análisis. Las cantidades relativas de los componentes individuales de los tratamientos se expresaron como porcentajes del área de los picos en relación al área total y como un promedio de las tres repeticiones. Asimismo, se realizó el análisis del extracto de PDA para descartar los metabolitos producto de la degradación del medio de cultivo presentes en las muestras. Los análisis se llevaron a cabo en la USAI de la Facultad de Química, UNAM (Macías-Rubalcava et al. 2010).

Con la finalidad de visualizar la distribución de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los tratamientos se realizó un diagrama de Venn con el programa VENNY (Oliveros 2007; Spraker et al. 2014). Sin embargo, debido a la complejidad en los perfiles de VOCs producidos en cada tratamiento, los resultados proporcionados por el diagrama de Venn también son complejos de describir. Por lo tanto, se realizó un análisis de correspondencias múltiples (MCA, por sus siglas en inglés) (Semmar 2013) para separar y comparar los perfiles de compuestos volátiles producidos en los tratamientos. El MCA se utilizó para determinar la relación perfil específico-tratamiento de la producción de compuestos orgánicos volátiles de acuerdo a la diversidad de familias químicas a las que pertenecen (es decir, monoterpenos, alcanos, cetonas, etc.), y la abundancia relativa (bajo, medio o alto). Adicionalmente, se evaluó el perfil de los VOCs de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y sus posibles cambios asociados con el tiempo y el tipo de interacción. Para el modelo se incluyó el tratamiento (Nod3, Nod5, Nod-Nod y Nod-Pyt); los VOCs compartidos entre 2, 3 o 4 tratamientos, en conjunto con la familia química y la abundancia relativa de los compuestos que se encuentran exclusivamente en un tratamiento.

Para el contenido relativo de los VOCs se utilizó la distribución percentil para cada condición experimental, y se separaron los porcentajes de área relativa de los compuestos en bajo (<33.3%) medio (33.3-66.7%) y alto (>66.7%). El MCA se realizó utilizando el software de análisis estadístico SAS 9.0, y los gráficos se construyeron con el software Prisma 6.0 GraphPad.

11.2. Identificación de los componentes volátiles presentes en el extracto del medio de cultivo, micelio y fracciones primarias no polares de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

La detección e identificación de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles presentes en el extracto activo de medio de cultivo, micelio y fracciones primarias (1-4), derivados del cultivo en CPD en pequeña escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se efectuó por CG-EM. Dos miligramos de la muestra disuelta en CH₂Cl₂ se inyectó al cromatógrafo de gases en modo splitless y siguiendo la metodología detallada anteriormente para la identificación de los compuestos volátiles. Asimismo, se realizó el análisis del extracto de diclorometano del medio de cultivo sin inocular e incubado bajo las mismas condiciones para descartar los metabolitos producto de la degradación del CPD presentes en los extractos fúngicos y fracciones cromatográficas.

VI. Resultados y Discusión

La presente investigación se realizó con el propósito de determinar el tipo de interacciones *in vitro* entre hongos endófitos de *Gliricidia sepium*, entre hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium* y entre hongos endófitos de *G. sepium* y fitopatógenos con importancia agrícola. Asimismo, con el propósito de aislar y/o caracterizar los metabolitos secundarios volátiles y no volátiles producidos por el hongo más competitivo, el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, y que son responsables de su actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica, y al mismo tiempo, inferir los mecanismos físicos y químicos involucrados en las relaciones fúngicas dentro de la planta hospedera, y establecer los mecanismos entre los hongos endófitos y microorganismos fitopatógenos, evaluando adicionalmente, el efecto fitotóxico de los extractos de los hongos endófitos, y de esta manera contribuir con el desarrollo de nuevos agentes agroquímicos alternativos o de control biológico.

Los resultados obtenidos se dividen en tres secciones, la primera corresponde al aislamiento de los hongos endófitos y fitopatógenos de plantas recolectadas de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH), y a la descripción morfológica de los hongos aislados de *G. sepium*. La segunda sección corresponde a los bioensayos de antagonismo entre hongos endófitos, y entre hongos endófitos y fitopatógenos. Finalmente, la tercera sección se refiere al aislamiento y caracterización de compuestos bioactivos del medio de cultivo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y a la identificación de los compuestos orgánicos volátiles que éste produce.

1. Aislamiento y purificación de hongos endófitos y fitopatógenos de hojas de plantas de la REBIOSH

El aislamiento de los hongos se realizó a partir de hojas de 11 plantas recolectadas en la REBIOSH, con base en el criterio ecológico aunado al criterio de plantas que crecen en zonas de alta biodiversidad (Yu et al. 2010). En total se obtuvieron aproximadamente 4310 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales, se purificaron 155 morfotipos. Con respecto a los hongos fitopatógenos, a partir de más de 840 aislamientos, se obtuvieron 50

morfotipos puros. Cabe destacar que para las plantas elegidas no se ha encontrado información en la literatura acerca del aislamiento o identificación de sus hongos endófitos. En el Cuadro 7 se muestra el total de aislamientos de hongos endófitos y fitopatógenos, así como los morfotipos puros por especie vegetal. También se observa que las hojas de las plantas seleccionadas están colonizadas por un mínimo de 7 hongos, en el caso de *L. acapulcense*, y un máximo de 30 hongos, como en el caso de *G. sepium*. Estos resultados indican que la mayoría de las plantas en estudio se encuentran colonizadas por un amplio número de hongos endófitos, en promedio 14 hongos, lo que concuerda con los datos reportados en la literatura para plantas leñosas, donde el número de endófitos es mayor que en los pastos (Van Bael et al. 2005). Asimismo, los resultados confirman que los criterios de selección empleados, es decir, plantas que crecen en áreas de gran diversidad biológica y que no presentan ningún daño por patógenos o herbívoros (criterio ecológico), constituyen una buena estrategia para aislar una gran cantidad y diversidad de endófitos (Yu et al. 2010; Sánchez-Fernández et al. 2013). Por otro lado, el número máximo de hongos fitopatógenos aislados de hojas con síntomas de enfermedad, como manchas foliares y clorosis fue de 8.

Con base en las interacciones antagónicas observadas durante la etapa de aislamiento y purificación de los hongos endófitos y fitopatógenos, se seleccionaron a los hongos de *G. sepium* para continuar con el desarrollo del presente proyecto de tesis.

Cabe mencionar que el aislamiento y purificación de los microorganismos asociados a plantas de la REBIOSH forma parte de un proyecto de investigación a largo plazo, el cual tiene como objetivo principal investigar diversos aspectos de la química ecológica de los hongos endófitos, y el papel que desempeñan los productos de su metabolismo secundario en las estrechas relaciones que establecen con otros organismos, así como, poner en evidencia su potencial uso en la agricultura y/o la medicina.

Cuadro 7. Número de aislamientos totales y morfotipos puros de hongos endófitos y fitopatógenos aislados de plantas de la Reserva de Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH)

Planta	Aislamientos totales de hongos endófitos	Morfotipos de hongos endófitos	Aislamientos totales de hongos fitopatógenos	Morfotipos de hongos fitopatógenos
<i>G. sepium</i>	384	30	7	4
<i>H. acapulcensis</i>	823	10	393	8
<i>H. brasiletto</i>	510	20	72	4
<i>S. macrocarpum</i>	360	18	20	2
<i>P. leucophyllum</i>	352	8	---	7
<i>M. affinis</i>	146	10	41	4
<i>L. acapulcense</i>	789	7	134	8
<i>B. linaloe</i>	318	19	26	1
<i>B. lancifolia</i>	134	8	69	2
<i>L. macrophyla</i>	123	13	---	---
<i>Salvia</i> sp.	255	12	173	8
Total	4310	155	840	50

--- No determinado.

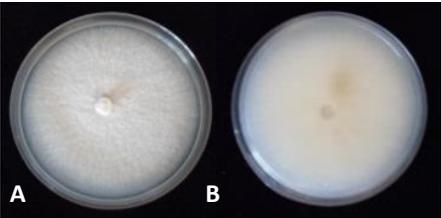
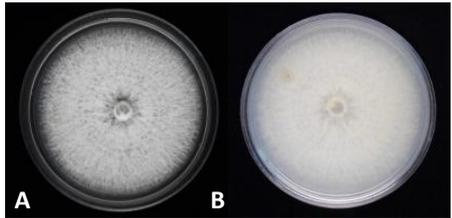
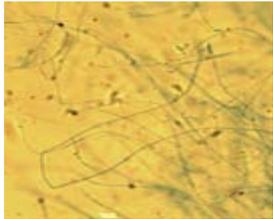
2. Determinación de la tasa de crecimiento, características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium*

La determinación de las características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *G. sepium* se realizó con 28 de los 30 morfotipos puros obtenidos, esto debido a que los demás aislamientos puros no siguieron creciendo en condiciones *in vitro*, asimismo, otras morfoespecies de hongos fitopatógenos cesaron su crecimiento en estas mismas condiciones, manteniéndose solo cuatro aislamientos viables. Se sabe que algunos hongos endófitos son más dependientes de su planta hospedera y no se desarrollan adecuadamente *in vitro*, y que probablemente varios de los hongos endófitos que colonizan a las hospederas en estudio no se lograron aislar con la metodología empleada, por lo que probablemente haya un mayor número de hongos colonizando las plantas recolectadas (Gamboa-Gaitán 2006).

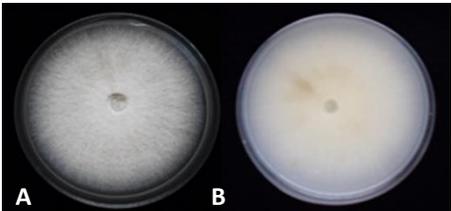
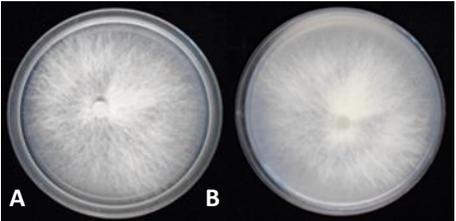
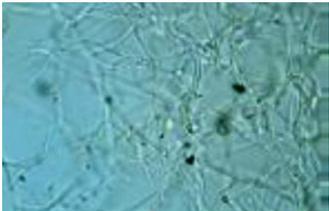
En los Cuadros 8 y 9 se muestran las características macroscópicas, microscópicas y la tasa de crecimiento de los morfotipos puros de los hongos endófitos y fitopatógenos, respectivamente. El estudio detallado de las características macroscópicas y microscópicas permitió la identificación tentativa de algunos morfotipos, como *Xylaria* sp. (GSE18, GSE21, GSE22, GSE25), *Fusarium* sp. (GSE11) y *Nodulisporium* sp. (GSE8, GSE9, GSE10, GSE12, GSE13, GSE14, GSE15 y GSE27). Estos géneros se han encontrado comúnmente como endófitos de plantas leñosas de clima tropical (Monaghan et al. 1995; Schulz & Boyle 2005; Gamboa-Gaitán 2006; Webster & Weber 2007; Weber 2009).

Asimismo, se puede observar que la mayoría de los hongos endófitos son de crecimiento lento, de color blanco y que no forman estructuras de reproducción, la cual es característica de los hongos endófitos (Selim et al. 2012).

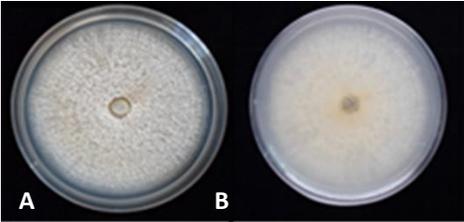
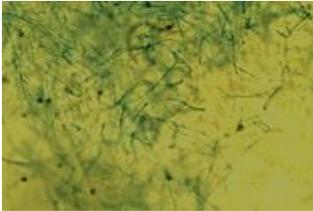
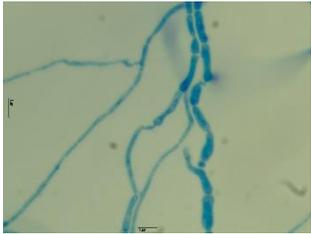
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium*

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE1	 <p>A. Micelio aéreo color blanco de apariencia algodonosa, superficie plana y de consistencia blanda. Presenta crecimiento radial con bordes regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso el micelio es color beige con algunas manchas color café claro.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas y septadas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	4.9
GSE2	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa de color blanco, superficie plana y de consistencia blanda. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color beige con algunas manchas cafés.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas y septadas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	5.1

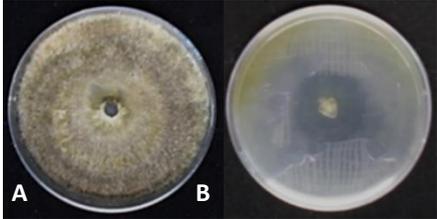
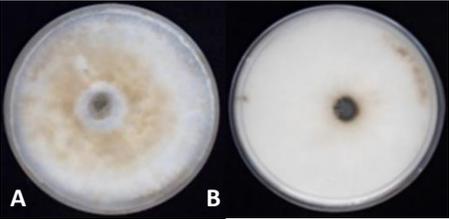
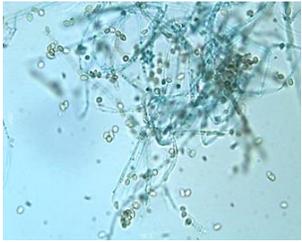
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE3	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere un ligero color beige con manchas café claro. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color beige con algunas manchas cafés.</p>	 <p>Hifas septadas, dematiáceas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	5.0
GSE4	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa, color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Su crecimiento es radial estrellado. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color blanco.</p>	 <p>Hifas hialinas, septadas, teñidas con azul de lactofenol, x1000. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	5.3

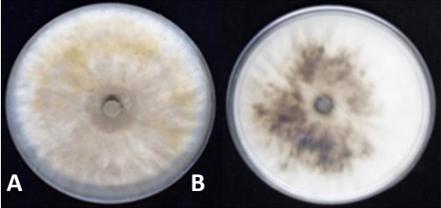
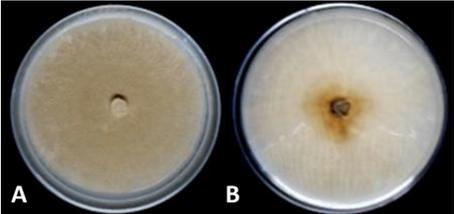
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE5	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/flocosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere un ligero color beige. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color durazno.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas, cenocíticas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	4.7
GSE6	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/esponjosa inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere un ligero color beige con manchas cafés. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y no produce pigmentos que difundan en el medio de cultivo. B. En el reverso, el micelio es color beige.</p>	 <p>Hifas hialinas, septadas, teñidas con azul de lactofenol, x1000.</p>	6.2

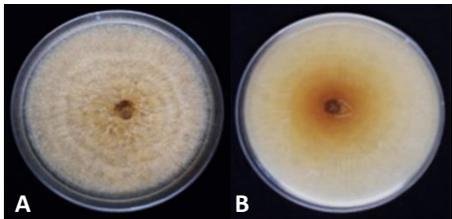
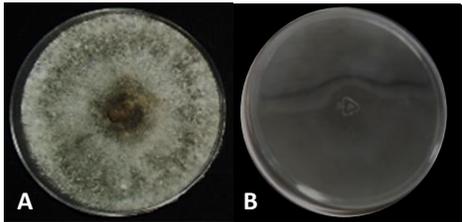
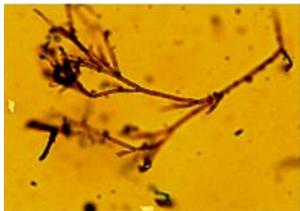
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE7	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/esponjosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se torna grisáceo y verde olivo, con manchas negras. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son irregulares. Produce exudado color amarillo. B. En el reverso el micelio inicialmente es color blanco con anillos concéntricos cafés y centro verde limón. Con el paso del tiempo adquiere una coloración negra con manchas verde limón en la orilla.</p>	 <p>Hifas gruesas, dematiáceas, septadas y microconidias redondas de color café, teñida con azul de lactofenol, x400.</p>	8.7
GSE8	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodónosa y polvosa, inicialmente de color blanco, de superficie umbonada y consistencia blanda. Produce esporas color café y su superficie se vuelve plana. Su crecimiento es radial con bordes regulares. Produce exudado color ámbar. B. En el reverso, el micelio es de color blanco con algunas zonas cafés, se observa el crecimiento de las hifas hacia la izquierda formando un remolino.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas, septadas y esporas ovaladas de color café, teñidas con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	10.0

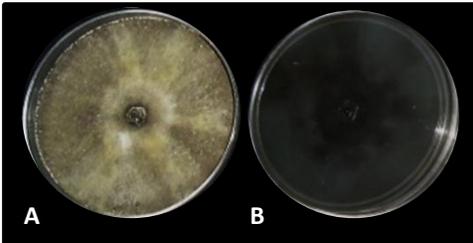
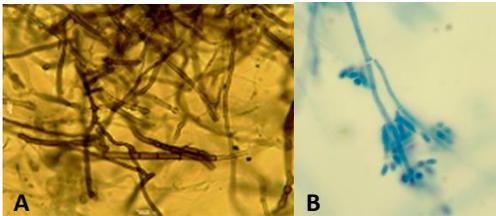
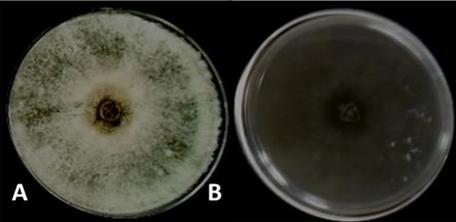
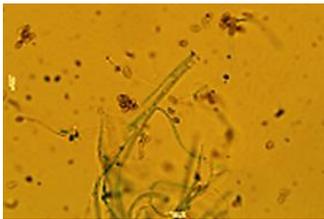
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE9	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodonosa y polvoso, inicialmente de color blanco con centro amarillo, de superficie umbonada y consistencia blanda. El hongo produce esporas de color café y algunas zonas se pigmentan de color ámbar, su superficie se vuelve plana. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado color ámbar. B. En el reverso, el micelio es color blanco con algunas zonas cafés.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas y esporas ovaladas color café, algunas se encuentran libres y otras agrupadas en racimos, teñidas con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	11.1
GSE10	 <p>A. Inicialmente, el micelio es aéreo de apariencia vellosa, de color blanco, superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo produce esporas de color café que cubren todo el micelio blanco y le dan apariencia polvosa. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro y amarillo. B. En el reverso, el micelio es de color blanco con centro café.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas y esporas ovaladas de color café, teñidas con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	9.4

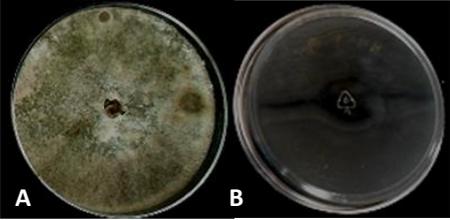
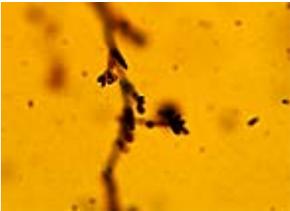
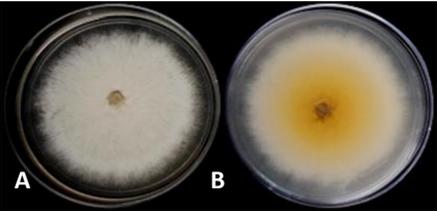
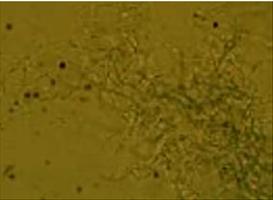
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE11	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/flocosa, de color rosa/durazno y centro color ámbar, de superficie plana y consistencia blanda. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color durazno con centro color café claro.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas y septadas, macroconidias en forma de huso, características del género <i>Fusarium</i> (Leslie & Summerell 2006). Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	11.7
GSE12	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una pigmentación color verde grisáceo. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco y gradualmente adquiere una coloración negra.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas, microconidias cafés, ovaladas, que nacen de conidióforos trifurcados. Tinción con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	13.4

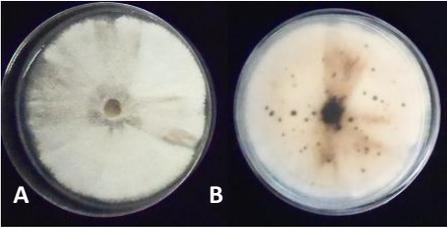
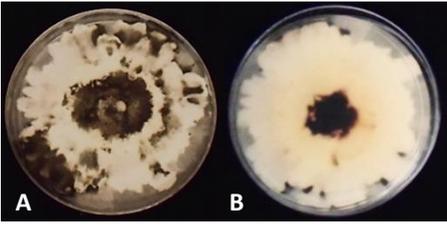
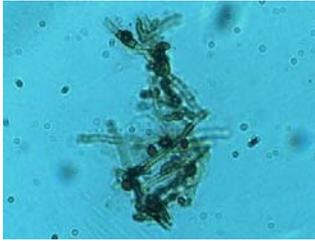
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE13	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco y centro grisáceo, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se pigmenta de color verde olivo-grisáceo con algunas zonas negras. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color amarillo. B. En el reverso el micelio es inicialmente de color blanco con centro amarillo, con el paso del tiempo adquiere una coloración completamente negra.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas A. Microconidias ovaladas, en racimos que nacen de conidióforos simples o bifurcados B. Tinción con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	13.4
GSE14	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, inicialmente de color blanco y centro verde grisáceo, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo adquiere una pigmentación gris oscuro-verdosa. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco con centro verde botella, con el paso del tiempo se torna color negro.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas; microconidias ovaladas de color café, teñidas con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	12.5

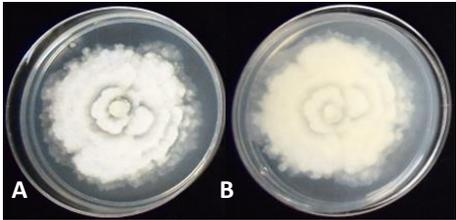
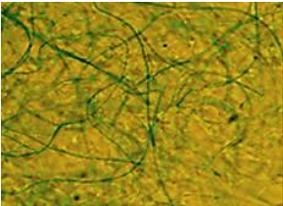
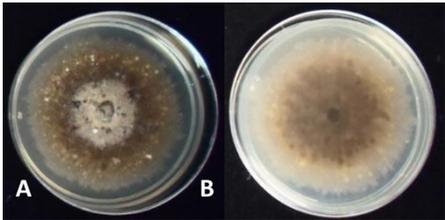
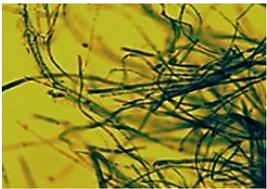
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE15	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/esponjosa, inicialmente color blanco con centro gris verdoso, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se pigmenta completamente de color gris verdoso y forma estromas color café. Su crecimiento radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color verde botella y amarillo. B. En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco, con el paso del tiempo se pigmenta completamente color negro.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas y microconidias ovaladas de color café (libres y en fiálides), teñidas con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	12.3
GSE16	 <p>A. Micelio aéreo de color blanco, de apariencia vellosa/esponjosa, de superficie plana y consistencia blanda. El micelio inmerso en el medio es de color amarillo. Su crecimiento es radial, limitado y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el anverso, el micelio es color beige con centro color amarillo.</p>	 <p>Hifas hialinas, esqueléticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción. Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	2.3

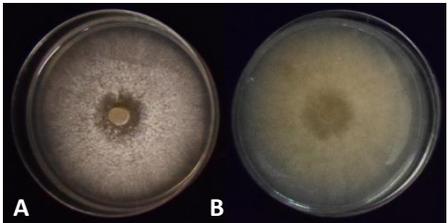
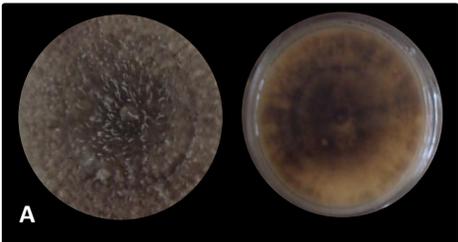
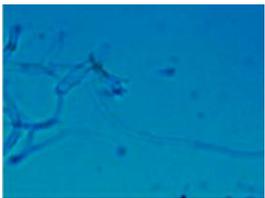
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE17	 <p>A. Micelio aéreo e inmerso de apariencia vellosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una pigmentación completamente café. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. El anverso, el micelio es color beige con zonas de color café.</p>	 <p>Hifas septadas, dematiáceas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción. Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	2.4
GSE18	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia plumosa, inicialmente de color beige con bordes color verde botella, de superficie plana y consistencia dura. Con el tiempo el micelio adquiere una coloración verde botella y produce pequeños estromas en el centro de la colonia. Su crecimiento es radial y sus bordes son lobulados. Produce exudado color ámbar. B. En el reverso, el micelio es color beige con zonas color negro. Estas características coinciden con las reportadas para el género <i>Xylaria</i> (Dugan 2006).</p>	 <p>Hifas hialinas, septadas, microconidias gutuladas de color café que nacen directamente de la hifa, teñidos con azul de lactofenol, x400.</p>	3.3

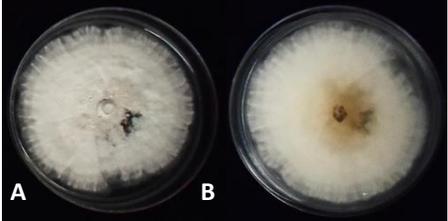
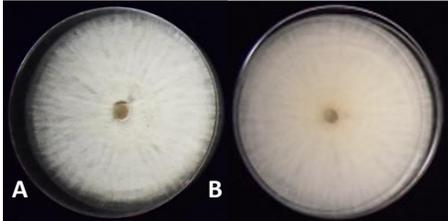
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE19	 <p>A. Micelio aéreo e inmerso de apariencia plumosa/velosa, zonado, de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Su crecimiento es radial limitado, forma anillos concéntricos y sus bordes son lobulados. Produce exudado incoloro. B. En el reverso el micelio inicialmente es color blanco, con el paso del tiempo adquiere una coloración amarilla.</p>	 <p>Hifas muy delgadas, hialinas, cenocíticas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	1.4
GSE20	 <p>A. Micelio inmerso de color café y micelio aéreo pegado al agar, inicialmente de color blanco, apariencia algodonosa, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se pigmenta de color café con zonas blancas lanosas. Su crecimiento es radial, limitado y sus bordes son regulares. Produce exudado de color café-anaranjado y produce pigmento café que difunde al medio de cultivo. B. En el reverso, el micelio es color café.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas, septadas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	1.1

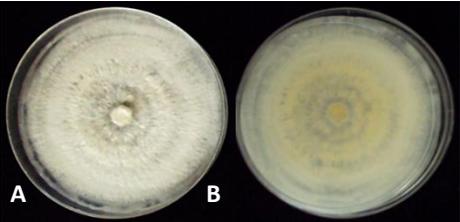
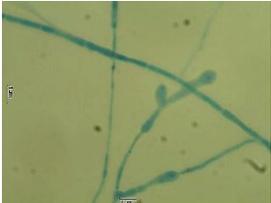
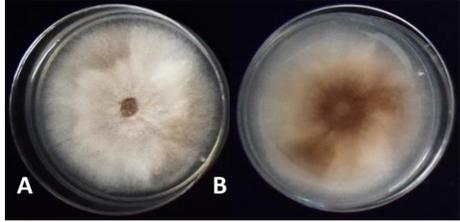
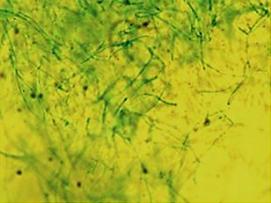
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE21	 <p>A. Micelio inmerso de color café y micelio aéreo de color blanco con zonas color beige, de apariencia algodonosa, de superficie plana y consistencia blanda. Con el tiempo produce pequeños estromas en el centro de la colonia. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color blanco con café. Estas características coinciden con las reportadas para el género <i>Xylaria</i> (Dugan 2006).</p>	 <p>Hifas hialinas, esqueléticas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	3.1
GSE22	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio se torna color café con beige. Su crecimiento es radial y sus bordes son regulares. Produce exudado color ámbar, el cual forma estromas largos y vellosos de color gris. B. En el reverso, el micelio es color beige con café. Estas características coinciden con las reportadas para el género <i>Xylaria</i> (Dugan 2006).</p>	 <p>Hifas hialinas, esqueléticas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	3.0

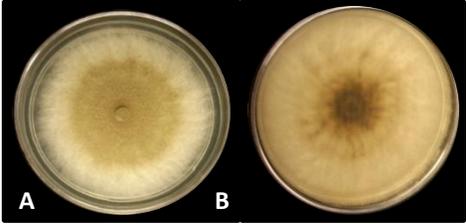
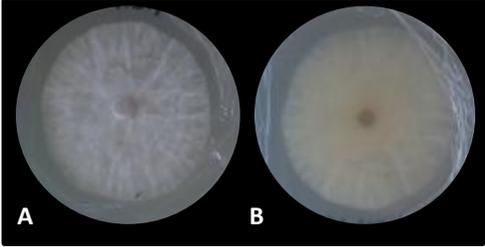
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE23	 <p>A. Micelio aéreo e inmerso de apariencia plumosa/algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo adquiere un ligero color beige. Su crecimiento es radial y sus bordes son irregulares. Produce exudado color durazno o incoloro. B. En el reverso, el micelio inicialmente es de color beige, con el paso del tiempo el centro adquiere una coloración café.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas, septadas y esporas redondas en cadena. Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	3.0
GSE24	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Su crecimiento es radial, forma un anillo concéntrico color café y sus bordes son regulares. Produce exudado incoloro. B. En el reverso, el micelio es color beige.</p>	 <p>Hifas muy delgadas, hialinas, y cenocíticas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	4.9

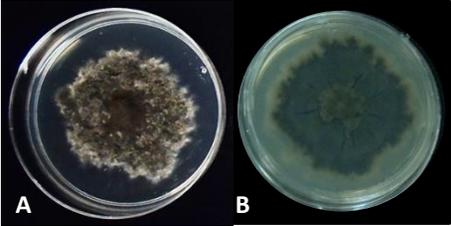
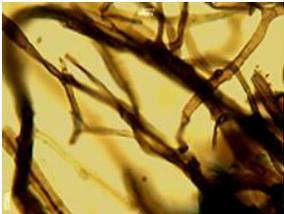
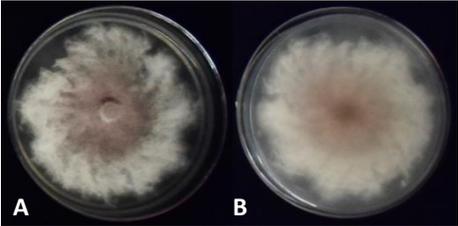
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE25	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa/algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo el micelio adquiere una coloración beige y produce estromas. Su crecimiento es radial, forma anillos concéntricos y sus bordes son regulares. Produce exudado color durazno y ámbar. B. En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco y con el paso del tiempo se torna color café claro. Estas características coinciden con las reportadas para el género <i>Xylaria</i> (Dugan 2006).</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas, septadas, se aprecian algunas clamidoconidias y microconidias de color café, ovaladas, que nacen de fiálides. Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	4.3
GSE26	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color blanco, de superficie plana y consistencia blanda. Con el paso del tiempo algunas zonas del micelio se pigmentan de color café. Su crecimiento es radial y sus bordes son irregulares. B. En el reverso, el micelio inicialmente es de color blanco, con el paso del tiempo adquiere una coloración café en algunas zonas.</p>	 <p>Hifas muy delgadas, hialinas, cenocíticas. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción. Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	4.0

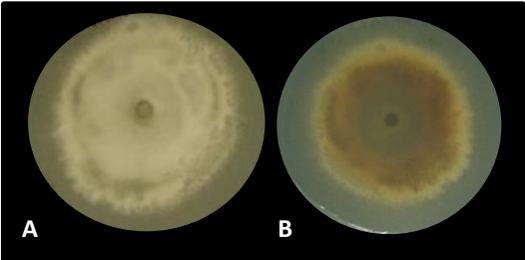
Cuadro 8. Características morfológicas de los hongos endófitos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSE27	 <p>A. Micelio aéreo, inicialmente café polvoso y orilla blanca vellosa, algodonosa, posteriormente café polvoso, con la esporulación, con orilla café y blanca; produce exudado hialino y naranja; de crecimiento radial y consistencia blanda. B. En el reverso, el micelio es blanco con centro café.</p>	 <p>Hifas septadas, dematiáceas, microconidias redondas o gutuladas color café que nacen de conidióforos bifurcados. Tinción con azul de lactofenol, x400. Sus características pertenecen al género <i>Nodulisporium</i> (Ju & Rogers 1996).</p>	10.42
GSE28	 <p>A. Micelio aéreo, vellosa con surcos, inicialmente color blanco, posteriormente blanco con orilla café. Superficie plana, consistencia blanda, produce exudado hialino, de crecimiento radial y lobulado. B. En su cara inferior es blanco con centro café.</p>	<p>Hifas muy delgadas, hialinas, con el tiempo son gruesas, dematiáceas y septadas cuando se tiñen con azul de lactofenol.</p>	4.05

Cuadro 9. Características morfológicas de los hongos fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium*

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSF1	 <p>A. Micelio inmerso y aéreo de apariencia algodonosa, inicialmente de color gris oxford con la orilla blanca, de superficie plana y consistencia dura. Con el paso del tiempo se pigmenta de color verde oscuro en algunas zonas y orilla blancas. Su crecimiento es radial limitado y sus bordes son irregulares. Produce exudado hialino y de color negro. B. En el reverso, el micelio es de verde oscuro con la orilla blanca.</p>	 <p>Hifas delgadas, dematiáceas, septadas, teñidas con azul de lactofenol, x400. Bajo estas condiciones de cultivo, no se logró observar estructuras de reproducción.</p>	1.1
GSF2	 <p>A. Micelio aéreo de apariencia vellosa, algodonosa, de color lila en el centro y orilla blanca, de superficie plana y consistencia blanda. Su crecimiento es radial y sus bordes son irregulares. Produce exudado incoloro y estromas verdes o azules. B. En el reverso, el micelio es de color morado y orilla blanca.</p>	 <p>Hifas delgadas, hialinas, septadas, esporas ovaladas que nacen de conidióforos cortos bifurcados con una sola espora. Esporas libres sin septos o con dos septos. Tinción con azul de lactofenol, x400.</p>	4.2

Cuadro 9. Características morfológicas de los hongos fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas	TC (cm ² /día)
GSF3	 <p>A. Micelio aéreo algodonoso, inicialmente de color gris-verdoso con orilla blanca. Posteriormente el micelio es liso, color verde oscuro/grisáceo con orilla blanca, de crecimiento radial, irregular y consistencia suave. Produce exudado hialino. B. En su cara inferior es color café-anaranjado y verde oscuro en el centro.</p>		9.42

3. Bioensayos de antagonismos entre hongos endófitos y entre endófitos y fitopatógenos aislados de *G. sepium*

Los 28 hongos endófitos y los tres hongos fitopatógenos aislados de *G. sepium* se clasificaron arbitrariamente en cinco categorías, de acuerdo a su tasa de crecimiento (Cuadro 10), así como, por las características morfológicas de las colonias (morfotipos) (Cuadro 11). Siguiendo esta clasificación, se realizaron los bioensayos de antagonismo entre hongos del mismo grupo.

Cuadro 10. Clasificación de los hongos endófitos y fitopatógenos de acuerdo a su tasa de crecimiento

Tasa de crecimiento (cm ² /día)	Hongos
Muy lenta (1.0-4.0)	GSE16, GSE17, GSE18, GSE19, GSE20, GSE21, GSE22, GSE23, GSE26, GSF1, GSE28
Lenta (4.1-6.5)	GSE1, GSE2, GSE3, GSE4, GSE5, GSE6, GSE24, GSE25, GSF2
Moderada (6.6-9.0)	GSE7
Rápida (9.1-12.0)	GSE8, GSE9, GSE10, GSE11, GSE27, GSF3
Muy rápida (12.1-13.5)	GSE12, GSE13, GSE14, GSE15

Cuadro 11. Hongos endófitos y fitopatógenos agrupados por su tasa de crecimiento y morfotipo

Grupo	Tasa de Crecimiento	Morfotipos	Hongos
I	Muy lenta y lenta	Micelio Blanco	GSE1, GSE2, GSE3, GSE4, GSE5, GSE6, GSE28
II	Muy lenta	Micelio de diferente color al blanco	GSE16, GSE17, GSE18
III	Muy lenta	Micelio de diferente color al blanco	GSE19, GSE20, GSF1
IV	Muy lenta	Micelio color blanco en el anverso y café en el reverso	GSE21, GSE22, GSE23
V	Lenta	Micelio de diferente color al blanco	GSE24, GSE25, GSE26, GSF2
VI	Rápida	Micelio de diferente color al blanco	GSE7, GSE8, GSE9, GSE10, GSE11, GSE27
VII	Muy rápida	Micelio color verde grisáceo	GSE12, GSE13, GSE14, GSE15, GSF3

3.1 . Antagonismos entre hongos del Grupo I

En el Cuadro 12 se muestra el resultado a las tres semanas de la interacción entre los hongos endófitos pertenecientes al grupo I. En todos los casos, se observó que las hifas de sus micelios cesaron su crecimiento y no hubo contacto, presentando una interacción tipo C (Cuadro 4). Sin embargo, hubo inhibición significativa del crecimiento de algunos hongos competidores mostrando porcentajes de inhibición menores al 30%. En consecuencia, el tipo de interacción es de antagonismo y es mediada por la producción de metabolitos secundarios (Tuininga, 2005) y por una fuerte competencia por espacio y nutrientes. A pesar de que el índice de antagonismo (IA) calculado con base en las interacciones establecidas entre los hongos competidores es el mismo para todos los hongos del grupo (Gráfica 1), el hongo más competitivo es el endófito GSE6 debido a que no es inhibido significativamente por la presencia de ninguno de sus competidores e inhibió el crecimiento de cuatro hongos.

Cuadro 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo I en bioensayos de antagonismo

Hongo endófito	GSE1	GSE2	GSE3	GSE4	GSE5	GSE6
GSE1	----	0.0±0.0	0.0±0.0	9.3±0.4	0.0±0.0	4.7±0.2
GSE2	23.1±2.2*	----	7.4±2.5	0.0±0.0	0.0±0.0	12.5±2.6
GSE3	25.0±3.7*	27.4±2.2*	----	4.8±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE4	19.7±2.0*	19.7±2.0*	14.3±2.1*	----	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE5	14.3±2.1	22.2±1.6*	14.5±2.5	12.9±3.8	----	5.0±0.3
GSE6	15.3±2.4*	22.9±2.5*	10.1±2.5	18.5±2.0*	28.3±1.8*	----

* $P < 0.05$, n = 4

3.2 . Antagonismos entre hongos del Grupo II

En el Cuadro 13 se muestran los porcentajes de inhibición de los hongos del grupo II a las tres semanas de interacción antagonista. El endófito GSE18 (*Xylaria* sp.) inhibió a sus competidores de manera significativa, y no fue inhibido por sus competidores, por lo que la interacción establecida es de tipo agonista, ya que crece encima de sus competidores completa o parcialmente (interacción tipo E1, Cuadro 4). Por otro lado, la interacción entre los hongos GSE17 y GSE16 es de coantagonismo, debido a que ambos microorganismos

cesan su crecimiento, y las hifas de sus micelios no se tocan por la liberación de metabolitos al medio de cultivo, sin embargo, la inhibición no es significativa indicando una fuerte competencia (Tuininga 2005, Rotheray et al. 2011). En la Gráfica 1 se muestra el IA de los hongos de este grupo, donde el hongo GSE18 tiene el valor más grande. Este endófito inhibe por medio de metabolitos secundarios e interacciones físicas.

Cuadro 13. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo II en bioensayos de antagonismo

Hongo endófito	GSE16	GSE17	GSE18
GSE16	----	15.9±2.3	0.0±0.0
GSE17	15.7±2.4	----	0.0±0.0
GSE18	100.0±0.0*	27.1±2.5*	----

* $P < 0.05$, n = 4

3.3 . Antagonismos entre hongos del Grupo III

En este grupo, solo se observó inhibición a distancia (interacción tipo D, Cuadro 4) sobre el crecimiento del endófito GS19 provocada por la presencia del hongo GSE20, es decir, la interacción establecida es de tipo antagonista mediada por la producción de metabolitos secundarios que se difunden en el medio de cultivo o por VOCs. Las demás interacciones mostradas fueron de coantagonismo, y a pesar de que no hubo inhibición significativa, se observaron cambios morfológicos en los micelios de los competidores, como son barreras miceliales y prolongaciones de micelio que se extienden hacia el endófito competidor (Tuininga, 2005). En el Cuadro 14, se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento de los endófitos del Grupo III en interacciones antagónicas a las tres semanas. El IA calculado indica que los hongos no son competitivos, comparado con el valor máximo de IA esperado que es de 12 (Gráfica 1).

Cuadro 14. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo III en bioensayos de antagonismo

Hongo	GSE19	GSE20	GSF1
GSE19	----	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE20	39.1±1.4*	----	0.0±0.0
GSF1	0.0±0.0	0.0±0.0	----

* $P < 0.05$, n = 4

3.4 . Antagonismos entre hongos del Grupo IV

En este grupo de hongos no hubo inhibición significativa del crecimiento de los endófitos competidores a las tres semanas de interacción (Cuadro 15). Las interacciones establecidas en el bioensayo fueron coantagonistas (Tuininga, 2005), ya que las hifas de los micelios cesaron su crecimiento o rodearon a la colonia del competidor, particularmente al endófito GSE21 (*Xylaria* sp.) sin hacer contacto entre sus hifas (interacción tipo C, Cuadro 4). Este comportamiento puede atribuirse a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, por parte de ambos endófitos, y que se difunden en el medio de cultivo cesando el crecimiento de ambas especies y, en consecuencia, sus micelios no hacen contacto. El hongo GSE321 tuvo el mayor IA (Gráfica 1), constituyendo el endófito más competitivo de este grupo.

Cuadro 15. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo IV en bioensayos de antagonismo

Hongo endófito	GSE21	GSE22	GSE23
GSE21	-----	13.3±2.9	11.4±2.0
GSE22	0.0±0.0	----	0.0±0.0
GSE23	0.0±0.0	0.0±0.0	----

* $P < 0.05$, n = 4

3.5 . Antagonismos entre hongos del Grupo V

En el Cuadro 16 se muestran los porcentajes de inhibición entre tres endófitos y un fitopatógeno de *G. sepium* a las tres semanas de interacción. Los hongos GSE24 y GSE25 (*Xylaria* sp.) inhiben de manera significativa el crecimiento del fitopatógeno GSF2, al crecer sobre éste parcial o completamente. Además, el micelio de GSE24 forma prolongaciones que se extienden sobre el micelio de GSF2 (interacción E1, Cuadro 4) por lo que la interacción es de agonismo, mediada por mecanismos físicos y químicos (metabolitos secundarios) (Tuininga, 2005). Por otro lado, los hongos GSE24 y GSE25 no se inhiben entre ellos, pero cesa su crecimiento (coantagonismo). El fitopatógeno GSF2 inhibió significativamente el crecimiento del endófito GSE26 (antagonismo). En la Gráfica 1 se observa que el hongo GSE26 muestra el valor de IA más alto.

Cuadro 16. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo V en bioensayos de antagonismo

Hongo	GSE24	GSE25	GSE26	GSF2
GSE24	----	0.0±0.0	0.0±0.0	57.9±0.0*
GSE25	0.0±0.0	----	17.0±2.9*	100.0±0.0*
GSE26	10.1±2.5	0.0±0.0	----	0.0±0.0
GSF2	0.0±0.0	0.0±0.0	34.1±3.2*	----

* $P < 0.05$, n = 4

3.6 . Antagonismos entre hongos del Grupo VI

En este grupo se encuentran los hongos pertenecientes a los géneros *Nodulisporium* (GSE8-GSE10) y *Fusarium* (GSE11). Se observa que *Nodulisporium* spp. inhiben significativamente el crecimiento del hongo GSE7, y sólo el endófito GSE10 inhibe a *Fusarium* sp. (GSE11) al crecer sobre su competidor, presentando una interacción agonista (interacción E1, Cuadro 4) a las tres semanas de competencia. Estas especies producen metabolitos secundarios antifúngicos aunados a la inhibición física mostrada. Asimismo, la interacción entre las especies de *Nodulisporium* fue de cohabitación ya que sus micelios crecen entremezclados sin inhibirse (Tuininga, 2005) (Cuadro 17). En la Gráfica 1 se muestra que el hongo GSE10 fue el más competitivo.

Cuadro 17. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo VI en bioensayos de antagonismo

Hongo endófito	GSE7	GSE8	GSE9	GSE10	GSE11
GSE7	----	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE8	53.5±1.5*	----	21.9±1.2	12.4±3.0	16.2±2.8
GSE9	45.7±3.1*	2.2±3.1	----	14.0±0.5	17.0±1.7
GSE10	63.4±1.3*	6.3±2.8	14.9±2.5	----	27.9±0.9*
GSE11	19.6±3.1	11.1±2.8	0.0±0.0	0.0±0.0	----

* $P < 0.05$, n = 4

3.7 . Antagonismos entre hongos del Grupo VII

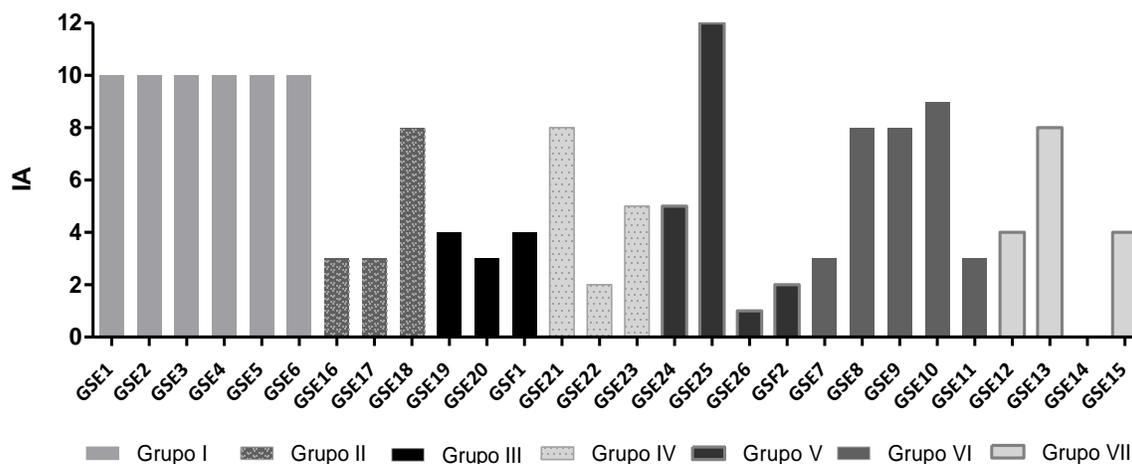
En este grupo se observa que, en general, no hubo inhibición importante del crecimiento, ya que a pesar de ser significativa en algunos casos, los porcentajes son aproximadamente del 20% a las tres semanas de interacción (Cuadro 18). El endófito GSE13 (*Nodulisporium*

sp.) es el único que formó barreras miceliales y produjo estromas en la zona de interacción y no fue inhibido por la presencia de sus competidores, siendo el único hongo antagonista. En las demás interacciones exhibidas, los hongos crecieron sin inhibirse, entremezclando las hifas de sus micelios, por lo que cohabitan en el mismo espacio (interacción A, Cuadro 4) (Tuininga, 2005). En la Gráfica 1 se observa que el hongo más competitivo fue el GSE13.

Cuadro 18. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos del grupo VII en bioensayos de antagonismo

Hongo endófito	GSE12	GSE13	GSE14	GSE15
GSE12	----	11.1±2.3	21.5±2.1*	8.3±3.0
GSE13	14.3±2.1	----	21.0±2.5*	15.6±2.3
GSE14	0.0±0.0	0.0±0.0	----	20.0±2.4*
GSE15	19.1±2.1*	10.4±2.3	5.7±2.3	----

* $P < 0.05$, $n = 4$



Gráfica 1. Índice de antagonismo (IA) de los hongos endófitos y fitopatógenos de *Gliricidia sepium* por grupo.

De cada grupo se eligieron a los hongos con el valor más alto de IA, ya que a mayor índice de antagonismo, el hongo domina e inhibe el crecimiento de un número mayor de competidores, es decir, es más competitivo (Yuen et al. 1999; Macías-Rubalcava et al. 2008).

3.8 . Antagonismos entre los hongos endófitos más competitivos

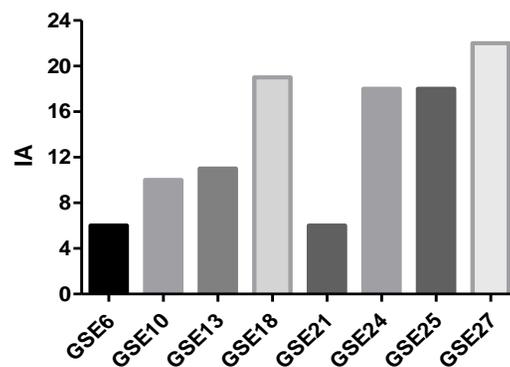
En el Cuadro 19 se muestran los porcentajes de inhibición a las tres semanas de interacción establecidas entre los endófitos más competitivos; los hongos GSE6, GSE10, GSE13, GSE18, GSE21, GSE24, GSE25 y GSE27. Solo seis de los endófitos inhibieron significativamente a dos o tres hongos competidores. Las interacciones establecidas entre los hongos GSE18 (*Xylaria* sp.), GSE24, GSE25 y GSE27 (*Nodulisporium* sp. GS4d2II1a), con sus competidores fueron del tipo agonista, debido a que crecieron sobre los hongos competidores, mostrando interacción física e inhibieron su crecimiento por medio de metabolitos secundarios. Asimismo, las especies de *Nodulisporium* interaccionaron entre sí de manera coantagonista, sin que sus micelios hicieran contacto (GSE13 y GSE18), y de cohabitación, entremezclando sus micelios (GSE10 y GSE13). En la Gráfica 2 se muestra los IA de los hongos endófitos seleccionados, observándose que el hongo más competitivo es el endófito GSE27 (*Nodulisporium* sp. GS4d2II1a), seguido de los hongos GSE18, GSE24 y GSE25.

Por otra parte, en la Figura 4 se muestran a manera de ejemplo los diferentes tipos de interacciones que se establecieron entre los hongos endófitos. Observándose principalmente, cambios morfológicos en las colonias, barreras miceliarias, prolongaciones del micelio y reemplazo de una colonia por el competidor. Asimismo, en muchas interacciones se observó la producción de pigmentos o metabolitos secundarios que se difunden en el medio de cultivo o en el micelio del competidor.

Cuadro 19. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos más competitivos de *Gliricidia sepium* en bioensayos de antagonismo

Hongo endófito	Grupo	GSE6	GSE10	GSE13	GSE18	GSE21	GSE24	GSE25	GSE27
GSE6	I	----	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE10	VI	20.9±2.6	----	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE13	VII	100.0±0.0*	0.0±0.0	----	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE18	II	100.0±0.0*	100.0±0.0*	100.0±0.0*	----	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE21	IV	14.9±2.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	----	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE24	V	23.9±3.1	96.9±2.7*	43.2±3.2	100.0±0.0*	62.7±1.6*	----	0.0±0.0	0.0±0.0
GSE25	V	65.2±2.6*	88.9±2.7*	16.6±2.1	45.5±0.0*	4.4±0.1	0.0±0.0	----	0.0±0.0
GSE27	VI	100.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0	35.7±16.6	100.0±0.0*	17.4±4.6	13.3±3.4	----

* $P < 0.05$, n = 4



Gráfica 2. Índice de antagonismo (IA) de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* más competitivos.



Figura 4. Selección de interacciones antagónicas entre endófitos aislados de *Gliricidia sepium*. GSE18 y GSE22: *Xylaria* sp., GSE11: *Fusarium* sp., GSE9, GSE10 y GSE13: *Nodulisporium* sp., GSE27: *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a.

3.9 . Antagonismos entre los hongos endófitos más competitivos y fitopatógenos aislados de *G. sepium*

En general, los hongos endófitos inhibieron significativamente el crecimiento del microorganismo fitopatógeno GSF2 de *G. sepium* por medio del crecimiento sobre éste y por la formación de prolongaciones del micelio (Cuadro 20 y Figura 5), interacción tipo E1, Cuadro 4, por lo que las interacciones son agonistas a las tres semanas. Asimismo, se observó la producción de pigmentos por parte de GSE10 y GSE27 en la zona de interacción fúngica (Figura 5). Sin embargo, GSF2 inhibió al endófito GSE26 (Cuadro 16), debido a que los hongos endófitos pueden producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno en particular o a otros endófitos de la hospedera (Arnold et al. 2003).

Cuadro 20. Porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos endófitos más competitivos de *Gliricidia sepium* con sus fitopatógenos

Hongo endófito	GSF2
GSE6	0.0±0.0
GSE10	65.7±11.1*
GSE13	100.0±0.0*
GSE18	26.8±5.0*
GSE21	0.0±0.0
GSE24	57.9±0.0*
GSE25	100.0±0.0*
GSE27	19.0±9.9

* $P < 0.05$, n = 4



Figura 5. Selección de interacciones antagonicas entre los hongos endófitos más competitivos y los fitopatógenos aislados ambos de *Gliricidia sepium*. GSE18 y GSE21: *Xylaria* sp., GSE10 y GSE13: *Nodulisporium* sp., GSE27: *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a.

Por último, los hongos endófitos más competitivos también se enfrentaron contra hongos y oomicetos de importancia en la agricultura.

3.10 Antagonismos entre los hongos endófitos más competitivos y hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia agrícola

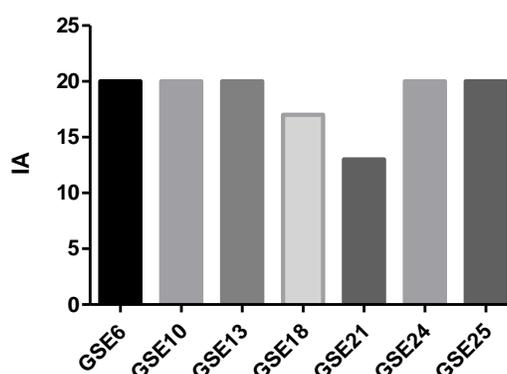
En el Cuadro 21 se observa que, en general, los endófitos inhibieron el crecimiento de los fitopatógenos de prueba de manera significativa. Con excepción de los endófitos GSE18 y GSE21, todos mostraron IA de 20, el cual es el valor máximo esperado (Gráfica 3), por lo que estos endófitos inhiben de manera directa el desarrollo de los fitopatógenos. Todos los endófitos evaluados interaccionan con los competidores fitopatógenos de manera agonista,

es decir, crecieron sobre las colonias de los fitopatógenos, inhibiendo su crecimiento (categoría E1, Cuadro 4). Asimismo, los endófitos presentaron cambios en su morfología al formar barreras miceliales (Figura 6) y producir pigmentos en la zona de interacción antagonica, indicando que las interacciones establecidas también están mediadas por la producción de metabolitos secundarios (Tuininga, 2005). En general, los oomicetos son los organismos más afectados inhibiendo su crecimiento en un 100%. Por lo que estos endófitos tienen potencial como agentes de control biológico (Tripathi et al. 2008).

Cuadro 21. Porcentajes de inhibición del crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola en bioensayos de antagonismo con los hongos endófitos más competitivos

Microorganismo	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Ph. parasitica</i>	<i>Ph. capsici</i>	<i>P. aphanidermatum</i>
GSE6	72.9±2.3*	16.7±2.9	100.0±0.0*	100.0±0.0*	100.0±0.0*
GSE10	48.3±2.9*	0.0±0.0	100.0±0.0*	100.0±0.0*	100.0±0.0*
GSE13	100.0±0.0*	83.1±2.0*	98.5±2.9*	38.6±1.6*	57.6±2.5*
GSE18	98.3±2.9*	33.9±2.3*	18.0±2.2	59.9±2.5*	0.0±0.0
GSE21	0.0±0.0	0.0±0.0	17.5±2.2	100.0±0.0*	29.9±3.0*
GSE24	100.0±0.0*	35.1±0.2*	100.0±0.0*	100.0±0.0*	100.0±0.0*
GSE25	100.0±0.0*	24.1±2.7*	100.0±0.0*	100.0±0.0*	12.5±3.5

* $P < 0.05$, $n = 4$



Gráfica 3. Índice de antagonismo (IA) de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* más competitivos en interacciones con los hongos y oomicetos fitopatógenos.



Figura 6. Selección de interacciones antagónicas entre endófitos competitivos y fitopatógenos de importancia agrícola. GSE18: *Xylaria* sp., GSE10: *Nodulisporium* sp.

3.11 Bioensayos de antagonismo directo entre *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura

El hongo endófito con clave GSE27 (*Nodulisporium* sp.), identificado inicialmente como aislamiento GS42d2II1a, y que a partir de esta sección se denominará como *Nodulisporium* sp. aislamiento GS42d2II1a, fue seleccionado para profundizar su estudio químico y biológico, debido en primera instancia a que tuvo el mayor IA (22 puntos) (Gráfica 2) y en segundo término a que durante las etapas de aislamiento y purificación de los hongos de *G. sepium* inhibía el crecimiento de los endófitos que emergían del mismo segmento de hoja que éste.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en bioensayos de antagonismo directo simple entre *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a y diferentes microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola. Inicialmente *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a mostró inhibición significativa sobre el crecimiento de los fitopatógenos con o sin contacto directo de su micelio, seguido por el crecimiento de su micelio sobre las colonias de los fitopatógenos competidores. Después de cuatro días de interacción antagónica, con excepción del oomiceto *P. aphanidermatum*, el endófito *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a inhibió totalmente el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos *Ph. capsici*, *Ph. cinnamomi* y *Ph. parasitica*. Transcurridos ocho días de interacción, *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a creció sobre las colonias de los fitopatógenos (reemplazo parcial) e inhibió totalmente el crecimiento de *P. ultimum*, *F. oxysporum* y *A. solani*, mientras que afectó

parcialmente el crecimiento de *P. aphanidermatum*. Finalmente, después de 11 días de incubación y hasta los 22 días de interacción, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a reemplazó completamente las colonias de seis de los nueve fitopatógenos probados: *P. aphanidermatum*, *Ph. capsici*, *Ph. palmivora*, *Ph. cinnamomi*, *Ph. parasitica* y *A. solani* (Cuadro 22). Adicionalmente, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a produjo pigmento amarillo en condiciones de interacción antagónica, especialmente con *P. aphanidermatum*.

Cuadro 22. Porcentajes de inhibición del crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola en bioensayos de antagonismo con los hongos endófitos más competitivos

Fitopatógeno	% Inhibición			Resultado de la interacción ^a	Recuperación a los 8 días
	4 días	8 días	11 días		
<i>P. aphanidermatum</i>	-1.7 ± 14.4 ^b	15.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0*	reemplazo	no
<i>P. ultimum</i>	62.5 ± 3.5*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	reemplazo parcial	si
<i>P. polytylum</i>	87.5 ± 3.5*	73.3 ± 2.8*	100.0 ± 0.0*	reemplazo parcial	si
<i>Ph. capsici</i>	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	reemplazo	no
<i>Ph. palmivora</i>	45.0 ± 0.0*	82.5 ± 3.5*	100.0 ± 0.0*	reemplazo	si
<i>Ph. cinnamomi</i>	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	reemplazo	no
<i>Ph. parasitica</i>	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	reemplazo	no
<i>F. oxysporum</i>	73.3 ± 2.8*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	reemplazo parcial	si
<i>A. solani</i>	72.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	100.0 ± 0.0*	reemplazo	si

^aResultado determinado a los 22 días de interacción antagónica: reemplazo parcial, donde el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a creció sobre su competidor, pero el micelio nunca alcanzó el lado opuesto de la placa; reemplazo, donde el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a creció completamente sobre su competidor (Rotheray et al. 2011). El porcentaje de inhibición se muestra como el promedio con su desviación estándar (n=3). **P*<0.05. ^bValores negativos significan estimulación de crecimiento.

En la Figura 7 se muestra manera de ejemplo el crecimiento de una colonia de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a los cuatro (Figura 7a) y ocho días (Figura 7b) de cultivo; una colonia de *Ph. capsici* cultivada por cuatro (Figura 7c) y diez días (Figura 7d); una colonia de *P. aphanidermatum* a los cuatro días de crecimiento (Figura 7E); y la interacción antagónica

entre el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los oomicetos fitopatógenos *Ph. capsici* a los cuatro (Figura 7f) y diez (Figura 7g) días, y *P. aphanidermatum* a los cuatro (Figura 7h) y 21 días (Figura 7i) de antagonismo, donde es evidente como *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a crece sobre ambos fitopatógenos.

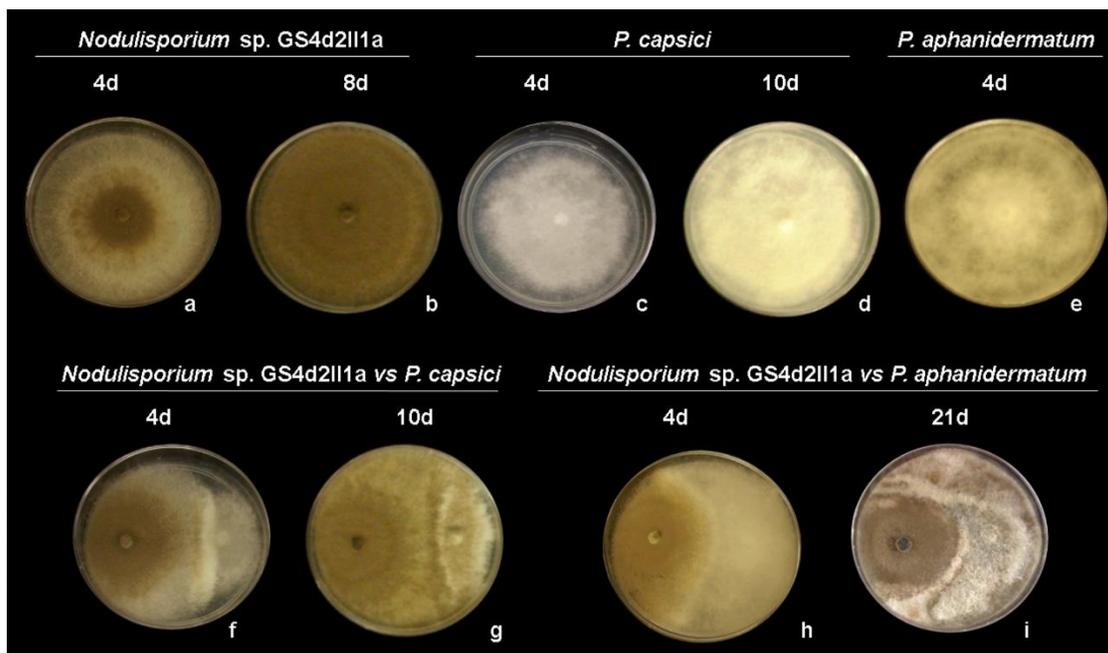


Figura 7. Colonias de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, hongo endófito aislado de *Gliricidia sepium*, *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* a diferentes días de crecimiento. Reemplazo de *Ph. capsici* y *P. aphanidermatum* por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a cuatro (a) y ocho días (b) de crecimiento. *Ph. capsici* a cuatro (c) y diez días (d) de crecimiento. *P. aphanidermatum* a cuatro días de crecimiento (e). *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a creciendo sobre *Ph. capsici* a los cuatro (f) y diez días (g) de interacción antagónica. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a creciendo sobre *P. aphanidermatum* a los cuatro (h) y 21 días (i) de interacción antagónica.

Cabe destacar que el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a eliminó a los oomicetos *P. aphanidermatum*, *Ph. capsici*, *Ph. cinnamomi* y *Ph. parasitica*, cuyo micelio fue reemplazado totalmente en los bioensayos antagonismo directo por el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, debido a que no fueron recuperados después de 22 días de interacción antagónica al transferir un inóculo de la zona donde se encontraban los fitopatógenos probados a una caja de cultivo sin la presencia del endófito (Cuadro 22). Por otra parte, a pesar de que *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a reemplazó parcialmente el micelio de *P. ultimum*, *P. polytylum*, y *F. oxysporum*, y totalmente el de los fitopatógenos *Ph. palmivora*

y *A. solani*, no los eliminó solo inhibió su crecimiento (Cuadro 22).

Los bioensayos de antagonismo directo llevados a cabo entre *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a y diferentes fitopatógenos con importancia agrícola, permitieron evidenciar que el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a establece una interacción agonista, inhibiendo el crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos mediante el reemplazo parcial o total de sus micelios. Asimismo, eliminó a cuatro oomicetos fitopatógenos, mostrando un IA de 36 puntos, siendo el valor máximo esperado. Los mecanismos que probablemente median las interacciones antagonicas observadas son micoparasitismo, depredación o interferencia hifal (mecanismos físicos de defensa), y la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (mecanismos químicos de defensa) (Boddy 2000; Gams et al. 2004; Tuininga 2005; Gao et al. 2010). Estudios posteriores permitirán demostrar cuál es el mecanismo principal cuando interactúan sus micelios.

En resumen, las interacciones entre los hongos, tanto entre endófitos como entre endófitos y fitopatógenos, fueron del tipo antagonista (-/0), coantagonista (-/-), agonista (-/+), y de cohabitación (0/0), donde los mecanismos que intervienen son la producción de metabolitos secundarios (alelopatía, interferencia hifal, antibiosis) y mecanismos físicos (micoparasitismo, barreras miceliales, etc.) (Widden 1997; Boddy 2000; Tuininga 2005). Por lo que las hojas de *G. sepium*, además de estar colonizadas por un amplio número de hongos endófitos, estos interactúan entre sí de diferentes maneras, formando un microambiente complejo, donde los hongos buscan preservar su lugar en la planta, obtener nutrientes, y al mismo tiempo protegerla de posibles ataques de hongos y oomicetos fitopatógenos de manera directa.

3.12 Bioensayos de antagonismo múltiple directo entre *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a y microorganismos fitopatógenos con importancia económica en la agricultura

Con la finalidad de establecer si las interacciones interespecíficas que se llevan a cabo entre *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a y los microorganismos fitopatógenos se ven influenciadas por la presencia de más de un competidor, se llevaron a cabo bioensayos de antagonismo múltiple directo entre *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a y los nueve microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola, incubando previamente al endófito por 3, 5, 7 y 9 días.

A continuación, se describen los resultados del bioensayos de antagonismo múltiple directo, mismos que demostraron que la actividad antifúngica de *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a es evidente después de tres (Nod3) y cinco días (Nod5) de crecimiento previo del endófito, por lo tanto, sólo se presentan los porcentajes de inhibición correspondiente a estos dos tiempos de cultivo.

En estas interacciones, *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a, incubado por tres y cinco días (Nod3 y Nod5), inhibió el crecimiento de los fitopatógenos a distancia a partir de los dos días de interacción antagónica, hasta los seis días (interacción tipo D, Cuadro 4). Esta observación indica que *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a produce VOCs con propiedades antifúngicas.

A los dos días de interacción antagónica, Nod3 inhibió significativamente el crecimiento de *A. solani* (25.4%). Después de cuatro días de interacción antagónica inhibió significativamente al oomiceto *P. aphanidermatum* (49.2%) y al hongo *F. oxysporum* (32.0%). A los seis días, Nod3 inhibió en mayor grado a *F. oxysporum* (73.8%) y *P. aphanidermatum* (62.6%). Por último, después de ocho días de antagonismo los microorganismos más afectados fueron *A. solani* (75.4%), *F. oxysporum* (72.5%) y *P. aphanidermatum* (72.6%) (Cuadro 23). Cabe señalar que al día ocho de interacción antagónica, las colonias de *Nodulisporium* sp. GS42d2II1a siguieron creciendo hasta que entraron en contacto con las nueve colonias de los fitopatógenos y comenzaron a crecer sobre estos.

Por otro lado, Nod5 inhibió a distancia a sus competidores fitopatógenos y también limitó su propio crecimiento (coantagonismo). A los dos días de interacción antagónica, Nod5

inhibió el crecimiento de los fitopatógenos a distancia de manera significativa, principalmente a *P. aphanidermatum* (58.8%) (Cuadro 23). Al cuarto día de antagonismo se observó inhibición significativa sobre el crecimiento de *A. solani*, *Ph. cinnamomi* y *P. aphanidermatum* (45.8, 41.0 y 78.1%, respectivamente). Después de seis días de interacción antagonista se mantuvo la inhibición sobre el oomiceto *P. aphanidermatum* (78.5%), y los hongos *F. oxysporum* y *A. solani* fueron inhibidos significativamente (67.0 y 51.0%, respectivamente) (Figura 8). Finalmente, después de ocho días de interacción antagonista la inhibición provocada sobre los competidores fitopatógenos se debió principalmente al contacto de los micelios (interacción tipo E1, Cuadro 4). La Figura 8 muestra el efecto de la producción de VOCs por Nod5 sobre el crecimiento de los fitopatógenos de prueba a los seis días de interacción antagonista.

Cabe destacar que cuando *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se cultivó durante siete y nueve días previo al bioensayo de antagonismo múltiple, su micelio casi cubría la superficie de la caja de Petri de 15 cm, por lo que entró en contacto rápidamente con las colonias de los fitopatógenos y suprimió su crecimiento (datos no mostrados), por lo tanto, estos tiempos no permitieron la observación de la inhibición distancia. Asimismo, se observó la producción del pigmento amarillo en la zona de interacción.

Cuadro 23. Porcentajes de inhibición de crecimiento radial de hongos y oomicetos fitopatógenos con importancia agrícola a los 2, 4, 6 y 8 días de interacción antagónica en los bioensayos de antagonismo múltiples directos con *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

Fitopatógeno	% Inhibición							
	2 días		4 días		6 días		8 días	
	Nod3 ^a	Nod5 ^b	Nod 3	Nod5	Nod3	Nod5	Nod3	Nod5
<i>P. aphanidermatum</i>	17.8 ± 5.7*	58.8 ± 6.4*	49.2 ± 0.8*	78.1 ± 4.8*	62.6 ± 4.8*	78.5 ± 4.0*	72.6 ± 13.7*	100.0 ± 0.0*
<i>P. ultimum</i>	5.1 ± 4.6	33.3 ± 4.1*	5.6 ± 3.5	39.2 ± 2.8*	33.3 ± 10.4*	30.3 ± 2.6*	50.0 ± 3.1*	100.0 ± 0.0*
<i>P. polytulum</i>	4.4 ± 4.0	34.6 ± 13.1*	12.9 ± 5.7	33.3 ± 10.9*	46.9 ± 9.9*	37.3 ± 5.7*	55.9 ± 6.9*	100.0 ± 0.0*
<i>Ph. capsici</i>	-6.4 ± 3.4	42.1 ± 5.3*	13.0 ± 6.2	31.4 ± 9.8*	54.4 ± 7.1*	34.5 ± 10.3*	65.9 ± 21.8	100.0 ± 0.0*
<i>Ph. palmivora</i>	5.1 ± 11.7	34.8 ± 11.4*	-2.1 ± 3.6	26.9 ± 5.4*	38.7 ± 10.3	28.0 ± 4.8*	49.9 ± 5.6	100.0 ± 0.0*
<i>Ph. cinnamomi</i>	13.6 ± 3.5*	23.7 ± 9.2*	32.0 ± 8.0*	41.0 ± 2.2*	38.1 ± 2.5*	42.6 ± 2.1*	66.7 ± 1.8*	100.0 ± 0.0*
<i>Ph. parasitica</i>	10.2 ± 4.4*	31.4 ± 4.2*	24.8 ± 4.6	26.4 ± 6.1	26.6 ± 9.4	30.0 ± 4.1	8.4 ± 11.3	100.0 ± 0.0*
<i>F. oxysporum</i>	19.1 ± 7.3*	38.3 ± 6.8*	32.0 ± 7.0*	35.1 ± 6.5*	73.8 ± 9.8*	67.0 ± 6.6*	72.5 ± 6.8*	100.0 ± 0.0*
<i>A. solani</i>	25.4 ± 10.7*	38.3 ± 6.8*	23.0 ± 9.8	45.8 ± 7.2*	39.8 ± 0.0*	51.0 ± 3.4*	75.4 ± 3.3*	100.0 ± 0.0*

^aNod3: *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a de 3 días de crecimiento. ^bNod5: *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a de 5 días de crecimiento. El porcentaje de inhibición se muestra como el promedio con su desviación estándar (n=3). *P<0.05.

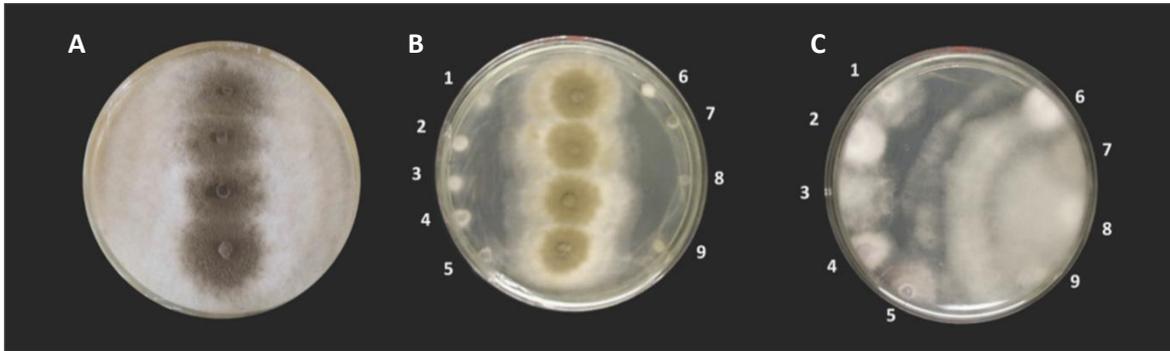


Figura 8. Bioensayo de antagonismo múltiple directo entre el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los microorganismos fitopatógenos de interés agrícola a los seis días de interacción. **A.** Control de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. **B.** Interacción antagonística. **C.** Control de crecimiento de los fitopatógenos. 1) *Phytophthora cinnamomi*, 2) *Pythium polytylum*, 3) *Phytophthora capsici*, 4) *Pythium ultimum*, 5) *Fusarium oxysporum*, 6) *Phytophthora palmivora*, 7) *Alternaria solani*, 8) *Pythium aphanidermatum*, 9) *Phytophthora parasitica*.

4. Evaluación de la actividad antifúngica y fitotóxica de compuestos volátiles de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

Con la finalidad de verificar si la inhibición a distancia observada en los bioensayos de antagonismo múltiple entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los microorganismos fitopatógenos fue debido a la producción de VOCs con propiedades antifúngicas, se realizaron bioensayos de antagonismo en cajas de Petri divididas empleando cinco diferentes tiempos de crecimiento del endófito (0, 3, 5, 7, y 13 días). Los resultados indican que la bioactividad de los VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) después de tres días de crecimiento previo (Nod3), inhibiendo el crecimiento de *Ph. parasitica* ($29.7 \pm 3.7\%$), *Ph. cinnamomi* ($18.1 \pm 4.3\%$), *Ph. capsici* ($25.7 \pm 1.2\%$) y *F. oxysporum* ($21.6 \pm 1.0\%$) después de tres días de antagonismo. Los VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, a los 0, 5, 7 y 13 días de cultivo previo no fueron activos sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba. Estos resultados indican que sí hay producción de VOCs bioactivos. Sin embargo, no se producen en una concentración suficiente para causar una mayor inhibición del crecimiento de los fitopatógenos, o se producen en mayor concentración cuando *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a está en interacción antagonística múltiple.

Por otro lado, los compuestos volátiles no tuvieron actividad fitotóxica significativa en ninguno de los días de prueba.

Los resultados obtenidos hasta el momento permitieron poner claramente en evidencia que algunos hongos endófitos aislados de *G. sepium* interactúan con otros microorganismos de manera directa o física, o bien, de manera indirecta o química, en consecuencia, con el fin de confirmar si los endófitos más competitivos producen metabolitos secundarios bioactivos, se procedió a determinar sus condiciones óptimas de crecimiento y a la obtención de sus extractos orgánicos.

5. Cultivo en pequeña escala de hongos endófitos de *G. sepium*

Las mejores condiciones de crecimiento de los hongos endófitos se establecieron mediante la realización de cultivos en pequeña escala, verificando el desarrollo de los microorganismos en distintas condiciones y tiempos de incubación a temperatura ambiente. En el Cuadro 24 se muestra el rendimiento de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *G. sepium* cultivados en dos o tres diferentes condiciones de cultivo. En general, los cultivos en CPD incubando a los microorganismos bajo condiciones estáticas y el cultivo en PDA permitieron el desarrollo apropiado de los hongos. Los medios de cultivo CPD y PDA son excelentes medios de fermentación para el desarrollo de hongos microscópicos, y el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos (Rosa et al. 2011). Con respecto a los cultivos en agitación los hongos endófitos de *G. sepium* no desarrollaron pellets, sino una biomasa filamentosa que era difícil de procesar, dificultando la obtención de extractos orgánicos, debido a esto no se siguió cultivando bajo esta condición.

Los mejores rendimientos de los extractos orgánicos se obtuvieron a partir de los cultivos en medio arroz, el cual es un medio adecuado para la producción de metabolitos secundarios y mejora el rendimiento de los extractos fúngicos (Sandoval-Espinosa 2014), sin embargo, en la mayoría de los cultivos, se obtuvo una gran cantidad de extracto oleoso que dificultaba su manejo, por lo que en algunos casos se realizó una partición con hexano-metanol. Además, los hongos de crecimiento muy lento no desarrollaron adecuadamente en MA.

Cuadro 24. Rendimiento de extractos orgánicos de cultivos en pequeña escala de hongos endófitos de *Gliricidia sepium*

Hongo endófito	Condiciones de cultivo	Tiempo de incubación	Extracto	Rendimiento (mg/L, mg/50 mL PDA o mg/300 g arroz)
GSE6	CPD estático	3 meses	Me Mi	139.8 143.2
	CPD agitación	NC		
	MA	3 meses 10 días	Arroz	4,744.4
GSE10 <i>Nodulisporium</i> sp.	CPD estático	1.5 meses	Me Mi	174.5 725.5
	CPD agitación	NC		
	MA	1.5 meses	Arroz	1872.4
GSE11 <i>Fusarium</i> sp.	CPD estático	3 meses	Me Mi	201.1 406.1
	CPD agitación	NC		
	MA	NC		
GSE13 <i>Nodulisporium</i> sp.	CPD estático	1.5 meses	Me Mi	163.7 620.5
	CPD agitación	NC		
	MA	2 meses	Arroz	808.0
GSE16	CPD estático	NC	---	---
	PDA	1.7 meses	Me y Mi CH ₂ Cl ₂ Me y Mi AcOEt	60.7 70.2
	MA	---	---	---
GSE18 <i>Xylaria</i> sp.	CPD estático	2 meses	Me	340.6
		3 meses	Mi Me y Mi	420.9 528.3
	CPD agitación	3 semanas	Me Mi	779.8 340.3
		MA	2.5 meses	Arroz
GSE20	CPD estático	---	---	---
	PDA	1.7 meses	Me y Mi CH ₂ Cl ₂ Me y Mi AcOEt	63.6 71.1
	MA	---	---	---

Me: extracto del medio de cultivo, Mi: extracto del micelio. --- No hubo desarrollo del hongo endófito bajo esta condición de cultivo. NC: No se cultivó en estas condiciones.

Cuadro 24. Rendimiento de extractos orgánicos de cultivos en pequeña escala de hongos endófitos de *Gliricidia sepium* (Continuación)

Hongo endófito	Condiciones de cultivo	Tiempo de incubación	Extracto	Rendimiento (mg/L, mg/50mL PDA o mg/300g arroz)	
GSE21 <i>Xylaria</i> sp.	CPD estático	3 meses	Me	186.0	
		4 meses	Mi	147.9	
	Me y Mi	524.1			
	CPD agitación	NC			
	MA	3 meses 10 días	Arroz	2508.4	
GSE22 <i>Xylaria</i> sp.	CPD estático	3 meses	Me	1236.0	
			Mi	157.2	
	CPD agitación	3 semanas	Me	644.8	
			Mi	101.3	
	MA	---	---	---	
GSE24	CPD estático	3 meses	Me	205.1	
			Mi	225.2	
	CPD agitación	NC			
	MA	3 meses 10 días	Arroz	970.5	
GSE25 <i>Xylaria</i> sp.	CPD estático	3 meses	Me	231.8	
			Mi	790.4	
	CPD agitación	NC			
	MA	3 meses 10 días	Arroz	1,857.1	
GSE27 <i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	CPD estático	2 meses	Me	111.7	
		4 meses	Mi	230.5	
				Me	697.9
				Mi	204.8
	CPD agitación	3 semanas	Me y Mi	516.2	
	MA	3 semanas	Total	2,515.2	
			Hex	2,405.0	
			MeOH	110.2	
	PDA	3 semanas	Me y Mi	51.22	
GSE28	CPD estático	4 meses	Me y Mi	528.8	
	CPD agitación	3 semanas	Me y Mi	434.6	
	MA	NC			

Me: extracto del medio de cultivo, Mi: extracto del micelio. --- No hubo desarrollo del hongo endófito bajo esta condición de cultivo. NC: No se cultivó en estas condiciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la extracción de los metabolitos secundarios producidos por los hongos de *G. sepium*, y de los obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo, la extracción con Amberlita® es un método eficiente para la obtención de mayor rendimiento del extracto orgánico en comparación con la extracción por métodos de partición–maceración con disolventes orgánicos.

Debido a la similitud cromatográfica (CCF) que mostraron los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio en varios de los cultivos de los endófitos, se decidió reunirlos antes de realizar las evaluaciones biológicas.

6. Evaluación del potencial antifúngico y fitotóxico de los extractos orgánicos derivados de los cultivos en pequeña escala

Con la intención de corroborar que el potencial antagonico, demostrado en los bioensayos de antagonismo por algunos endófitos de *G. sepium*, es debido principalmente a la producción de metabolitos secundarios bioactivos, se evaluó el efecto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba. De manera adicional, se evaluó la posible interacción endófito planta mediante la determinación del efecto de los extractos sobre la germinación y la longitud de la raíz de dos plantas modelo. Estos resultados, además permitirán establecer su potencial uso como agentes fitotóxicos de interés comercial.

En general, los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio inhibieron significativamente el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de interés agrícola y de las plantas de prueba, confirmando que los hongos endófitos seleccionados producen metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano, los cuales son los responsables de la inhibición observada en los bioensayos de antagonismo *in vitro* y posiblemente estén involucrados en los mecanismos de defensa de su hospedera. Además, producen metabolitos secundarios fitotóxicos los cuales posiblemente beneficien a su hospedera evitando la presencia de competidores vegetales.

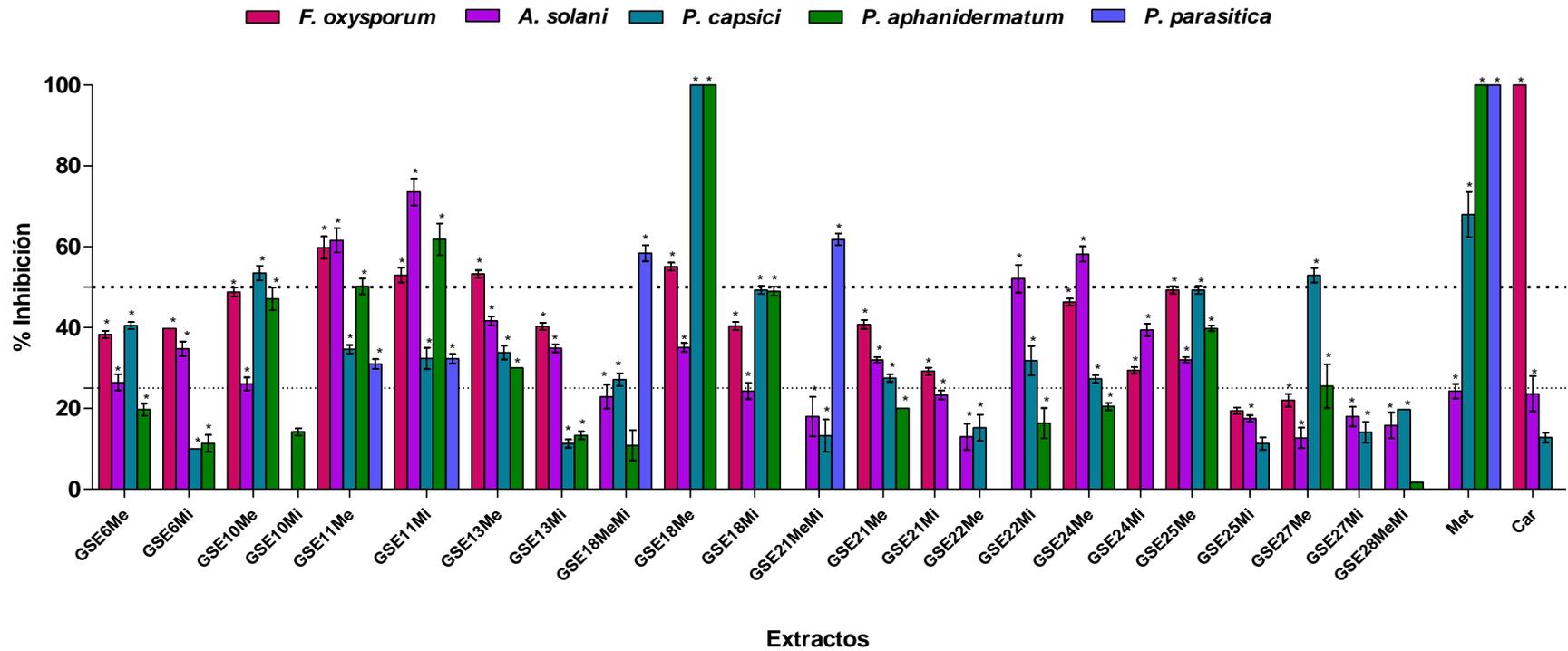
En las Gráficas 4-6 se muestra la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los cultivos en CPD incubados bajo condiciones estáticas y de agitación, en medio PDA, y en MA.

En la Gráfica 4 se aprecia que de los 11 hongos endófitos cultivados en CPD en condiciones estáticas, se obtuvieron 23 extractos, de los cuales, 21 extractos mostraron inhibiciones estadísticamente significativas sobre el crecimiento de al menos uno de los fitopatógenos de prueba. El porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de los hongos y oomicetos de prueba se agrupó arbitrariamente en bajo (1-24%), moderado (25-50%) y alto (51-100%) (Sánchez-Fernández et al. 2013). La inhibición provocada por los extractos activos fue en su mayoría moderada y en menor proporción alta, 38 valores fueron moderados y 16 fueron altos. El microorganismo más afectado fue *A. solani*, seguido de *Ph. capsici*, *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum* y *Ph. parasitica*. El extracto con la mayor actividad antifúngica y antioomiceto fue el derivado del medio de cultivo del hongo GSE18 cultivado en CPD en condiciones estáticas.

En la Gráfica 5 se observa que de los cuatro endófitos cultivados en CPD e incubados en condiciones de agitación, se obtuvieron seis extractos que inhibieron al menos a un fitopatógeno de prueba. El hongo *A. solani* fue el microorganismo más afectado por los extractos fúngicos, seguido de los oomicetos *Ph. parasitica* y *Ph. capsici*. Bajo estas condiciones de cultivo no se vio favorecida la producción de metabolitos secundarios bioactivos contra *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum*. El extracto con mayor actividad biológica fue el de CH₂Cl₂ obtenido a partir del micelio del endófito GSE18. En general, la actividad biológica demostrada fue baja y moderada (Sánchez-Fernández et al. 2013). Con base en estos resultados es evidente que esta condición de fermentación no es adecuada para el desarrollo y obtención de metabolitos secundarios antifúngicos y antioomiceto producidos por hongos endófitos de *G. sepium*.

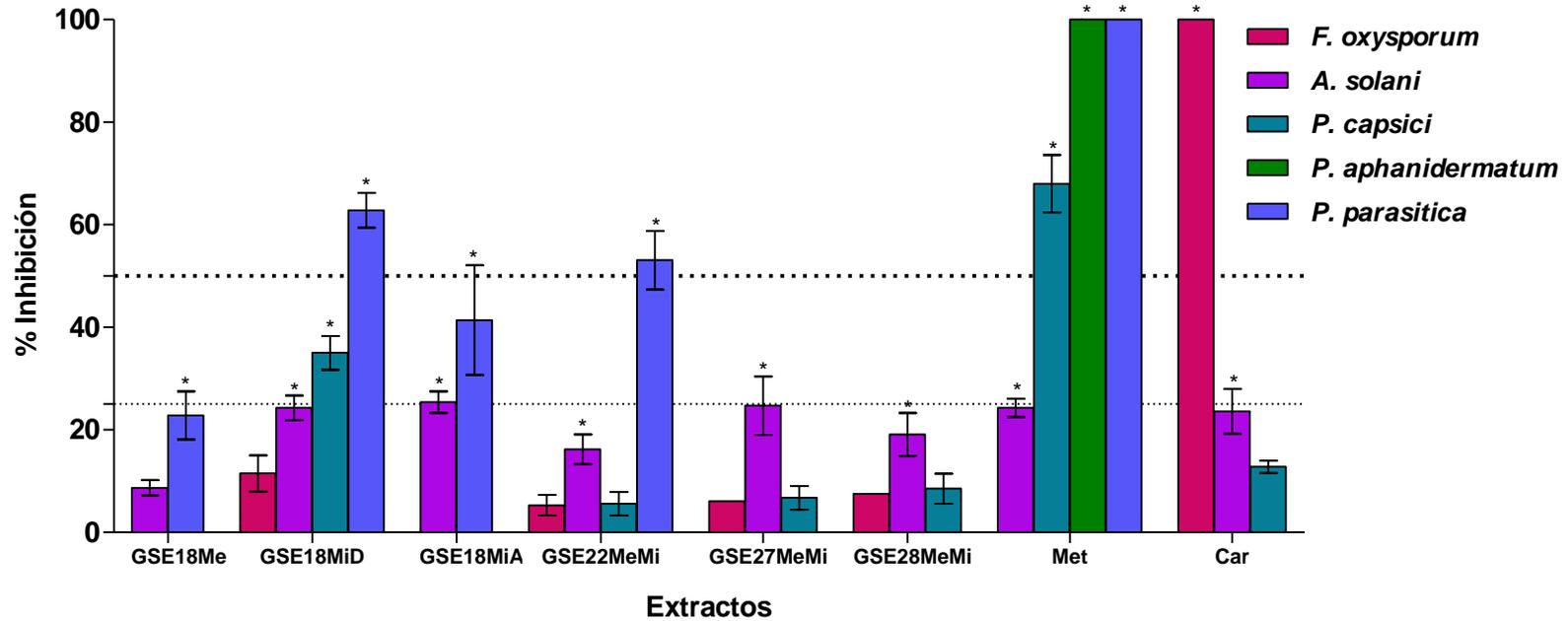
En la Gráfica 6 se muestra que de los diez hongos endófitos cultivados en medios sólidos (PDA y MA), se obtuvieron 20 extractos, de los cuales nueve tuvieron actividad antifúngica y antioomiceto significativa, principalmente, contra *P. aphanidermatum* (ocho extractos); seis extractos mostraron actividad significativa contra *A. solani*, y tres extractos presentaron actividad significativa sobre *F. oxysporum*, *Ph. parasitica* y *Ph. capsici*. En general, la actividad biológica fue baja, siendo el extracto de CH₂Cl₂ del hongo GSE20 cultivado en PDA el más activo. En esta gráfica también se puede apreciar que el medio MA no favoreció la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas ni antioomiceto.

Actividad Antifúngica de extractos de endófitos cultivados en CPD estático



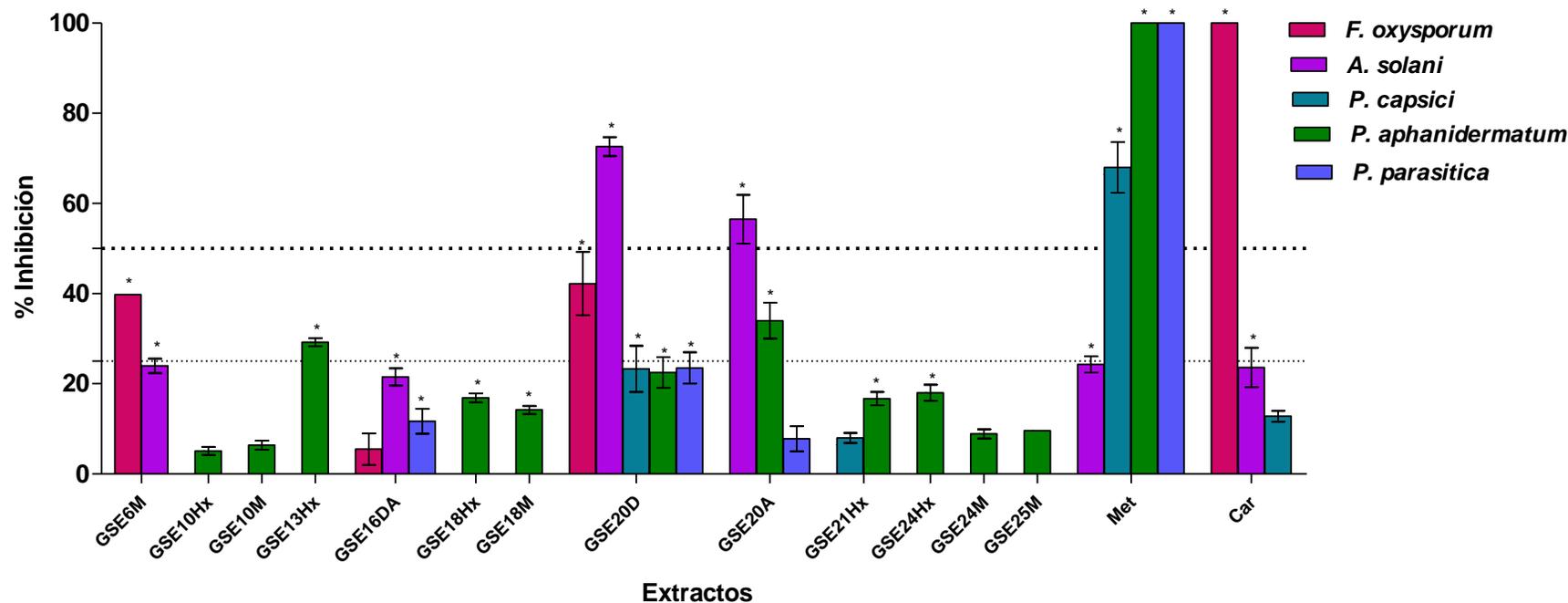
Gráfica 4. Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación estáticas. Me: extracto del medio de cultivo, Mi: extracto del micelio, Met: Metalaxil-M, Car: Carbendazim. (*) Los valores de inhibición del crecimiento estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

Actividad antifúngica de extractos de endófitos cultivados en CPD en agitación



Gráfica 5. Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación en agitación. Me: extracto del medio de cultivo, Mi: extracto del micelio, MiD: extracto de CH₂Cl₂ del micelio, MiA: extracto de AcOEt del micelio. Met: Metalaxil-M, Car: Carbendazim. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

Actividad antifúngica de extractos de endófitos cultivados en PDA y MA



Gráfica 6. Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* cultivados en agar papa-dextrosa (PDA) y medio arroz (MA). D: extracto de CH₂Cl₂, M: extracto de MeOH, Hx: extracto de Hex, A: extracto de AcOEt. Met: Metalaxil-M, Car: Carbendazim. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

Con base en los resultados obtenidos, la mejor condición de cultivo para la obtención de metabolitos secundarios antimicrobianos fue medio CPD incubando a los microorganismos en condiciones estáticas.

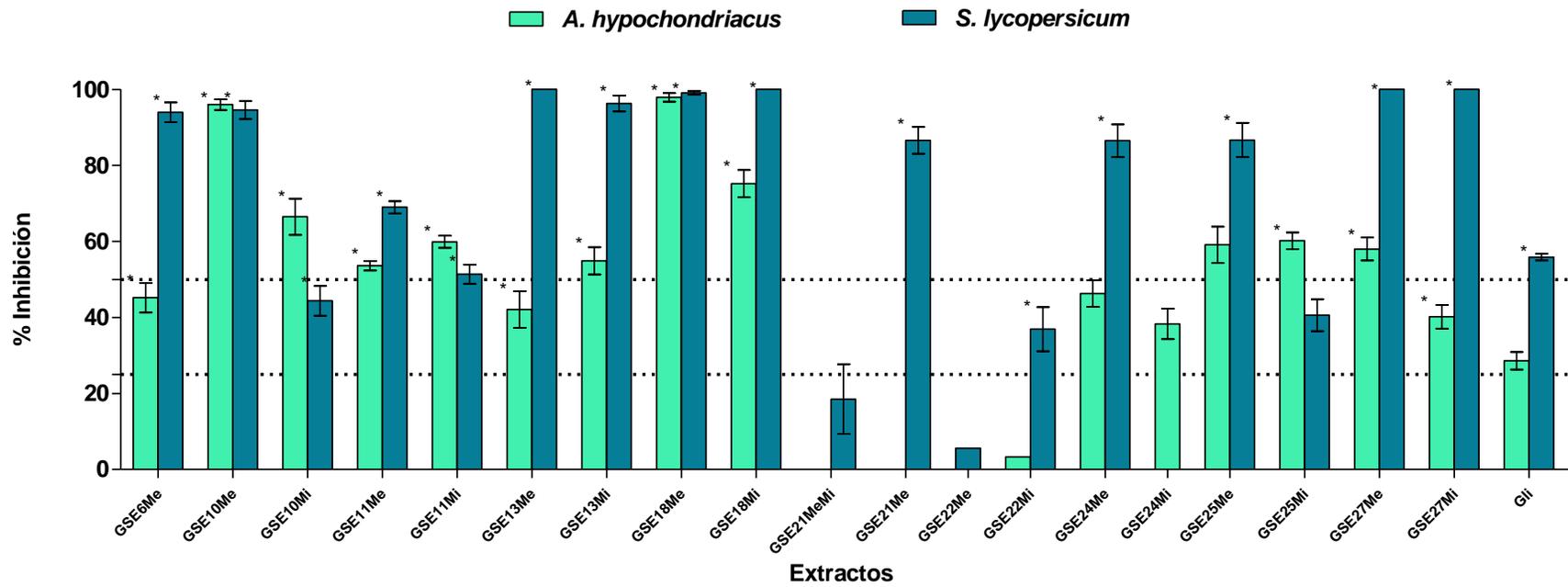
Con respecto a la actividad fitotóxica, en las Gráficas 7-9 se puede observar, la actividad biológica, de los extractos orgánicos obtenidos en CPD (estático y agitación), en medio PDA y en MA. Los porcentajes de inhibición obtenidos también se agruparon arbitrariamente en bajo (1-24%), moderado (25-50%) y alto (51-100%) (Sánchez-Fernández et al. 2013).

En la Gráfica 7 se observa que de los 23 extractos derivados del cultivo de los 11 endófitos en medio CPD e incubados de manera estática, 16 presentaron actividad fitotóxica significativa, la cual fue mayor sobre el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum*. En general, los extractos fúngicos poseen actividad fitotóxica alta, 11 extractos orgánicos provocaron un efecto inhibitorio significativo sobre una o las dos plantas de prueba en más del 75%. Los extractos más activos fueron los del medio de cultivo de los endófitos GSE10 y GSE18, inhibiendo el crecimiento de la raíz de las dos plantas de prueba en aproximadamente 100%.

En la Gráfica 8 se aprecia que de los seis extractos fúngicos obtenidos del cultivo en CPD bajo condiciones de agitación de cuatro de los hongos en estudio, únicamente los extractos del micelio obtenido con CH_2Cl_2 del endófito GSE18 y el del medio de cultivo y micelio del hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (GSE27), mostraron actividad fitotóxica significativa, este último endófito inhibió en 100% la germinación y crecimiento de la raíz de las semillas de *S. lycopersicum*, y en un 89.5% el crecimiento de *A hypochondriacus*. Las condiciones de agitación favorecieron la producción de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico en el hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a.

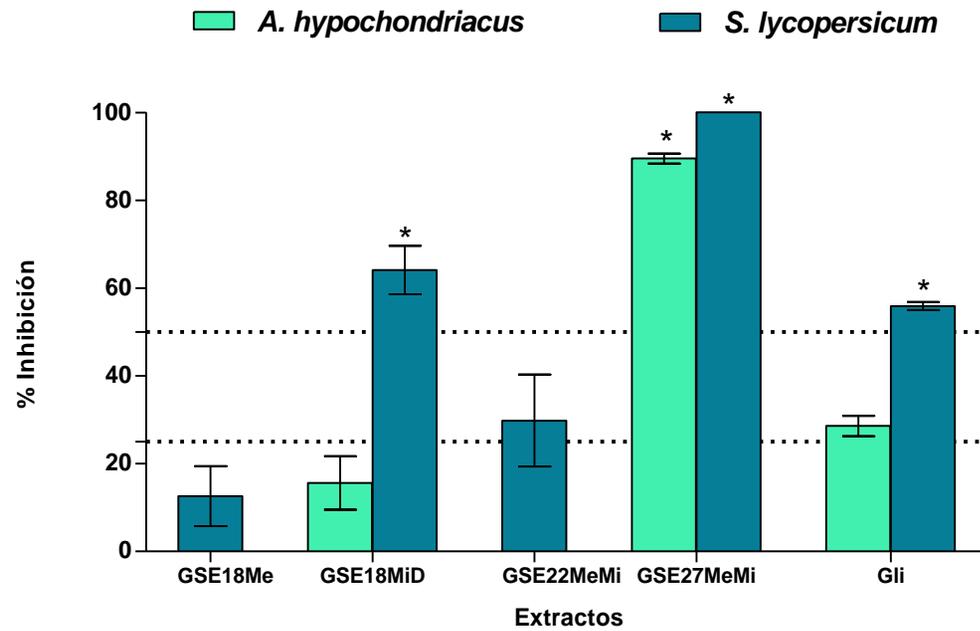
En la Gráfica 9 se aprecia que de los 19 extractos fúngicos procedentes del cultivo de 10 de los hongos endófitos en medio PDA y MA (medios sólidos), 17 mostraron actividad fitotóxica significativa, y en su mayoría alta. Provocando porcentajes de inhibición arriba del 75% sobre el crecimiento de la raíz de *S. lycopersicum*, siendo esta la semilla más afectada. La fracción hexánica del extracto derivado del cultivo en MA del hongo GSE13 inhibió en un 100% el crecimiento de ambas semillas de prueba.

Actividad fitotóxica de extractos de endófitos cultivados en CPD estático



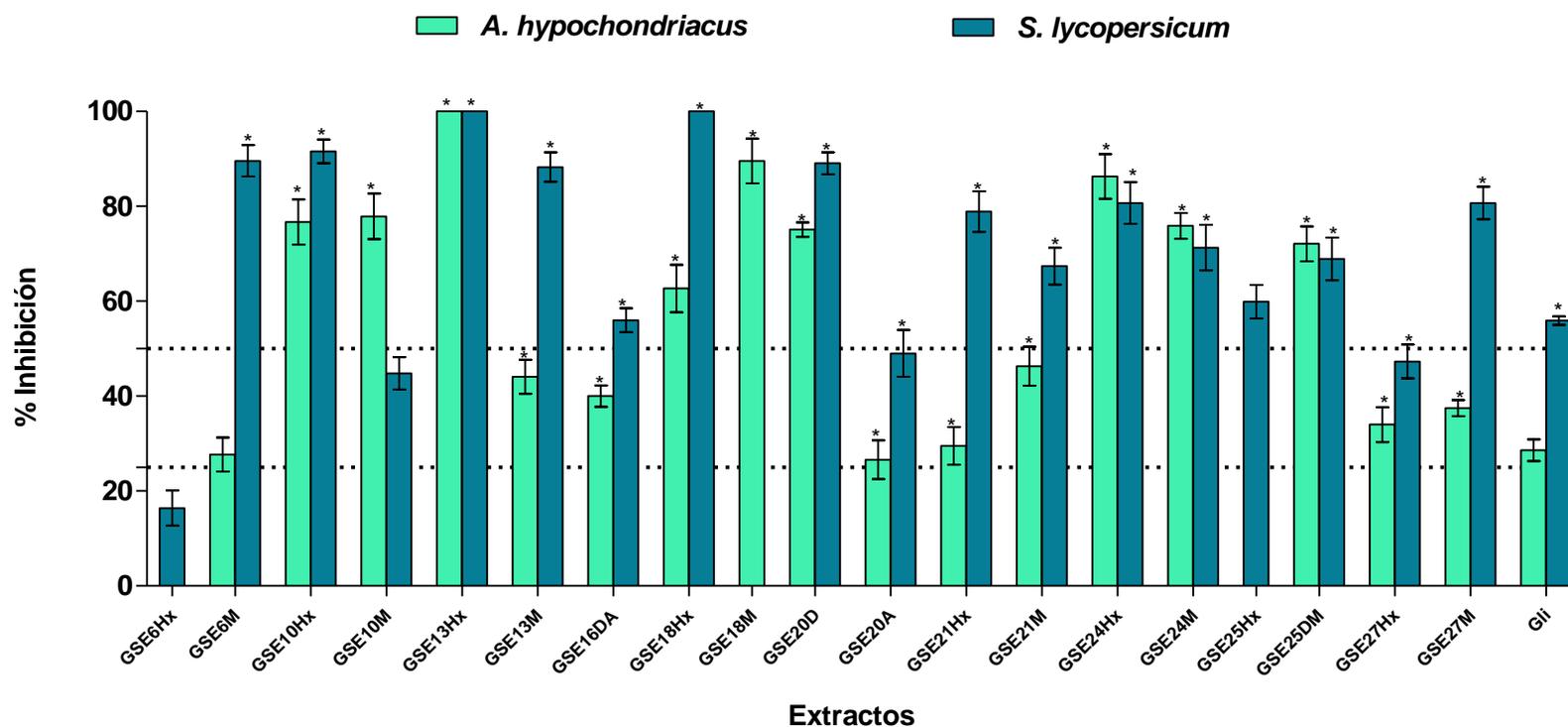
Gráfica 7. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación estáticas. Me: extracto del medio de cultivo, Mi: extracto del micelio. Gli: Glifosato. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

Actividad fitotóxica de extractos de endófitos cultivados en CPD en agitación



Gráfica 8. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* cultivados en caldo papa dextrosa (CPD) bajo condiciones de incubación en agitación. Me: extracto del medio de cultivo, Mi: extracto del micelio. MiD: extracto de CH_2Cl_2 del micelio. Gli: Glifosato. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

Actividad fitotóxica de extractos de endófitos cultivados en PDA y MA



Gráfica 9. Actividad fitotóxica de los extractos orgánicos de los hongos endófitos de *Gliricidia sepium* cultivados en agar papa-dextrosa (PDA) y medio arroz (MA). D: extracto de CH₂Cl₂, M: extracto de MeOH, Hx: extracto de Hex, A: extracto de ACOEt, M: extracto de MeOH. Gli: Glifosato. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

La determinación de la actividad inhibitoria de los extractos fúngicos sobre el crecimiento de las semillas de *A hypochondriacus* y *S. lycopersicum* permitió establecer que las mejores condiciones de cultivo de los endófitos, para la obtención de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico, fueron en el medio de cultivo CPD incubando bajo condiciones estáticas y cultivos sólidos en MA y PDA.

La actividad biológica de los extractos orgánicos depende del medio de cultivo, de las condiciones (estáticas vs agitación) y tiempo de incubación, así como, del propio hongo endófito, ya que no todos los hongos pueden inhibir a las mismas especies de fitopatógenos (Herre et al. 2007). Como ejemplo tenemos el extracto del medio de cultivo del hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (GSE27), el cual posee actividad antifúngica y fitotóxica cuando es cultivado por un periodo de dos meses bajo condiciones estáticas en CPD (Gráficas 1 y 4). A mayor periodo de incubación (cuatro meses) la actividad biológica se pierde o cambia, observándose estimulación significativa del crecimiento de *P. aphanidermatum*. El extracto del medio de cultivo lo estimuló en 16.9% y el extracto del micelio en 19.7%. En contraste, el cultivo obtenido bajo condiciones de agitación (tres semanas) permitió obtener metabolitos secundarios con mayor potencial fitotóxico (Gráfica 5).

Los bioensayos de actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica demostraron que todos los hongos endófitos cultivados producen compuestos antimicrobianos y/o fitotóxicos. Lo anterior concuerda con lo demostrado por los estudios realizados por Schulz y colaboradores en 2002, donde aislaron ~6500 hongos endófitos de plantas herbáceas y leñosas, y el 80% de los hongos produjeron compuestos bioactivos, detectados en bioensayos de actividad herbicida, fungicida y antibacteriana.

Cabe mencionar que bajo las condiciones de cultivo empleadas, los hongos endófitos de *G. sepium* producen en mayor grado metabolitos secundarios con propiedades fitotóxicas que antifúngicas y antioomiceto. Los metabolitos secundarios antifúngicos podrían proteger directamente a la hospedera contra hongos y oomicetos fitopatógenos, y también podrían

ayudar a que el hongo endófito colonice y se establezca en su nicho dentro de la planta hospedera, ya que debe producir compuesto antifúngicos para competir por espacio y nutrientes con otros hongos endófitos que colonizan la hospedera (Gao et al. 2010). Por otra parte, los hongos endófitos de *G. sepium* son capaces de producir metabolitos fitotóxicos ya que deben de producirlos para poder infectar a su hospedera, así como, mantenerse en equilibrio balanceado dentro de la planta (Schulz et al. 2002).

A manera de resumen, a partir de los 30 hongos endófitos de *G. sepium* que se confirmó su pureza mediante el análisis detallado de sus características morfológicas macro y microscópicas, se realizaron diversos bioensayos de antagonismo directo, 13 de ellos se cultivaron en pequeña escala en una o dos condiciones, y se determinó la actividad biológica de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y micelio de los hongos endófitos. Además, se realizó la identificación taxonómica de algunos de los hongos más competitivos y cuyos extractos tuvieron actividad biológica importante. Con base en la actividad biológica demostrada por los extractos fúngicos, y de las interacciones observadas en los bioensayos de antagonismo directo, se decidió identificar la especie y cultivar en mediana escala al hongo endófito *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a bajo condiciones estáticas, para su posterior estudio químico biodirigido.

7. Identificación molecular de algunos de los hongos endófitos más competitivos

La identificación de los endófitos GSE8, GSE11, GSE13, GSE21 y GSE25 se realizó mediante la comparación de la secuencia de la región ITS1-5.8s-ITS2 con las depositadas en la base de datos del GenkBank.

La secuencia del hongo GSE8 dio la más alta similitud (99%) con la de *Hypoxylon anthochroum*, sin embargo, las características morfológicas de este hongo indican que pertenece al género *Nodulisporium* sp., el cual es anamorfo de *Hypoxylon* (Ellis 1971; Ju & Rogers 1996). En consecuencia este hongo fue identificado como *Nodulisporium* sp. GSE8 anamorfo de *H. anthochroum*.

El hongo GSE11 fue identificado como *Fusarium equisetii* (99% similitud) y concuerda con las características morfológicas observadas (Leslie & Summerell 2006).

Con respecto al hongo GSE13, este fue identificado como *Nodulisporium* sp. con base a sus características morfológicas. Al comparar la secuencia de la región ITS dio la más alta similitud (99%) con la especie *Daldinia eschscholtzii*, este género también tiene como estado anamórfico a *Nodulisporium* (Monaghan et al. 1995; Webster & Weber 2007), por lo que este hongo fue identificado como *Nodulisporium* sp. GSE13 anamorfo de *D. eschscholtzii*.

Finalmente, los hongos GSE21 y GSE25 fueron identificados como *Xylaria* sp. con base a la secuencia de la región ITS (similitud del 99%) y a sus características morfológicas (Dugan 2006).

8. Identificación del hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (GSE27)

La identidad del aislamiento GS4d2II1a (GSE27) se estableció de acuerdo a sus características macro y micro-morfológicas, por lo que fue identificado como *Nodulisporium* sp., anamorfo de *Hypoxyton anthochroum* (Ellis 1971; Ju & Rogers 1996). La colonia en PDA a 28 °C crece de manera rápida y cubre la superficie de la caja Petri de 9 cm en una semana, con una tasa de crecimiento de 10.42 cm²/día. Inicialmente la colonia es blanquecina (M5A1), posteriormente, se vuelve de color amarillo-marrón pálido (M6E3) con la esporulación, y es aterciopelada. En el reverso es de color marrón oscuro (M7F3). La esporulación se restringe, inicialmente, al centro de la colonia (Figura 9a) y, posteriormente, se extiende en toda la colonia. Los conidióforos son macronematosos, mononematosos, ramificados y peniciliados en el ápice; de color hialinos a marrón claro, de 7.8-21 x 2.5-3.8 µm, que sostienen conidios lisos, elipsoidales u ovoides y de color marrón claro a marrón, de 5-7.5 x 2.7-2.7 µm (Figura 9b-9e). La colonia en OA incubada a 28 °C creció más lento que en PDA, cubriendo la caja de Petri en dos semanas. El micelio es blanco, convirtiéndose en marrón (M6E5), con la esporulación. El reverso de la colonia es blanco. La esporulación se presenta sobre toda la superficie de la colonia. La estructura conidiógena es similar a la de *Nodulisporium*; con un eje central y ramas adicionales, resultando en una estructura compleja; de color hialina a amarillenta, de textura lisa a finamente rugosa. Las células

conidiógenas y los conidios son similares en forma y tamaño a los descritos en PDA. Los cultivos secos en PDA y OA fueron depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, con el número de colección MEXU 27-541.



Figura 9. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a anamorfo de *Hypoxylon anthochroum*. **a** Colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C. **b, c** Conidióforos ramificados y peniciliados, lisos o ligeramente rugosos; **d** Células conidiógenas que sostienen conidios lisos, elipsoidales u ovoides, de color marrón claro a marrón, teñidas con fucsina láctica (x750). **e** Células conidiógenas con conidios ovoides, teñidas con fucsina láctica (x950).

La comparación de la secuencia del ITS-5.8-ITS2 en la base de datos del GenBank dio la mayor similitud (99%) con la especie *H. anthochroum* (número de acceso KF192825 y JN660819, con un 95% de cobertura), y con *Hypoxylon griseobrunneum* (número de acceso KC96892, con un 96% de cobertura), cuyo estado anamórfico es *Nodulisporium*. El número de acceso de la secuencia ITS-5.8-ITS2 en GenBank de la cepa GS4d2II1a es KM516709. El análisis de Neighbor-Joining muestra la posición de este aislamiento con varias cepas de *H. anthochroum* y de *H. griseobrunneum*, inferidos a partir de secuencias ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 10). Este método no nos permite concluir respecto a qué especie pertenece la cepa GS4d2II1a, si a *H. anthochroum* o a *H. griseobrunneum*, ya que no se formaron linajes

independientes. Sin embargo, la morfología macro y microscópica que es básicamente su patrón ramificado de tipo *Nodulisporium* corrobora la identificación de la cepa GS4d2II1a como *Nodulisporium* sp., anamorfo de *H. anthochroum*, y no de *H. griseobrunneum* que presenta una estructura conidiógena de tipo *Vigariella* (Ju & Rogers 1996; Kuhnert et al. 2014).

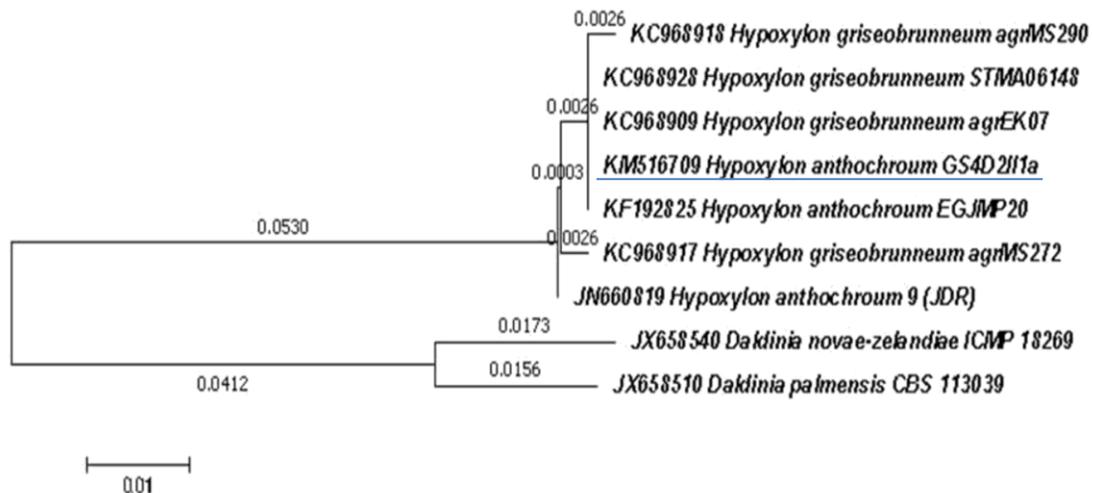


Figura 10. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias de GenBank con identidad más alta (>95%) con la secuencia del ITS-5.8s del aislamiento GS4d2II1a.

9. Cultivo a mediana escala

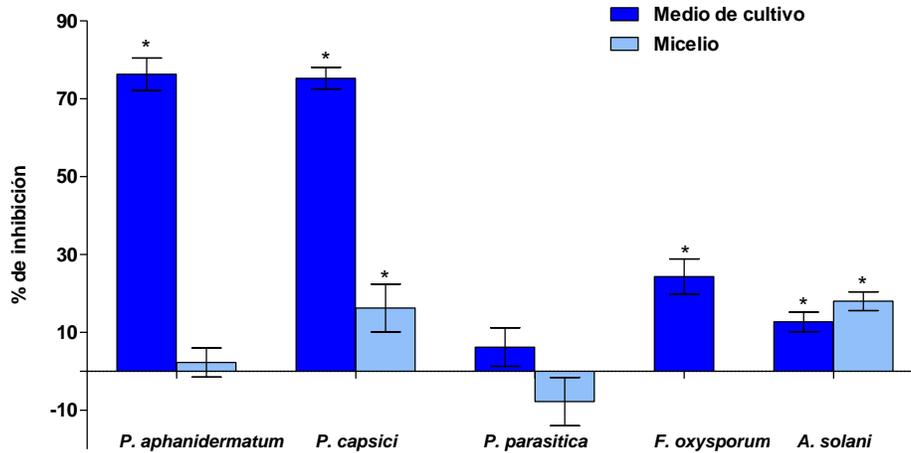
El endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se cultivó en mediana escala empleando las mejores condiciones de crecimiento previamente establecidas, utilizando 35 L de medio CPD e incubado al hongo bajo condiciones estáticas por un periodo de 1.5 meses. Al término de la fermentación se obtuvieron 3.7 g de extracto sólido de medio de cultivo, color marrón y con un rendimiento de 98 mg/L. Con respecto al extracto orgánico del micelio se obtuvieron 2.26 g de extracto de apariencia oleosa y de color marrón, con un rendimiento de 611 mg/L. En la Figura 11 se observan los perfiles cromatográficos de los extractos del medio de cultivo y del micelio, donde se puede observar que son diferentes. El extracto del medio de cultivo muestra la presencia de mayor cantidad de compuestos de naturaleza polar, y el del micelio se compone en su mayoría, de compuestos medianamente polares y no polares.



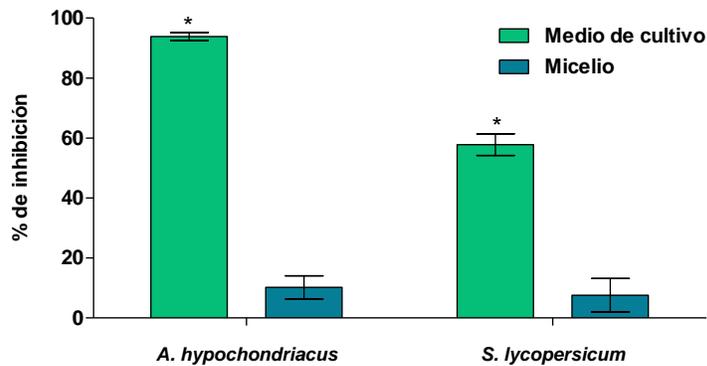
Figura 11. Cromatografía en capa fina de los extractos del medio de cultivo y micelio del endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Me: extracto del medio de cultivo. Mi: extracto del micelio. Sistema de elución: CH₂Cl₂-MeOH (94:6). Revelado con H₂SO₄ al 10% / 85 °C.

En la Gráfica 10 se muestra la actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos del medio de cultivo y del micelio, observándose que el microorganismo más afectado fue el oomiceto *Ph. capsici* y que *Ph. parasitica* no fue afectada por los extractos fúngicos. Asimismo, se aprecia que la actividad antimicrobiana provocada por el extracto del medio de cultivo en mediana escala es mayor que la provocada por el extracto del micelio, y por la demostrada por los extractos derivados del cultivo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en pequeña escala (Gráfica 4), debido a que inhibe de manera significativa y con porcentajes de inhibición altos (superior al ~75%) a los oomicetos *P. aphanidermatum* y *Ph. capsici*, y de manera moderada (25-50%) y baja (1-24%), a los hongos *F. oxysporum* y *A. solani*, respectivamente (Gráfica 4).

Con respecto a la actividad fitotóxica, en la Gráfica 11 se observa que sólo el extracto del medio de cultivo inhibió significativamente el crecimiento de la raíz de las dos plantas de prueba, mostrando porcentajes de inhibición altos (>50%). Esta inhibición es diferente a la exhibida por los extractos en pequeña escala (Gráfica 7).



Gráfica 10. Actividad antifúngica y antioomiceto de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio derivados del cultivo en mediana escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos de importancia agrícola. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).



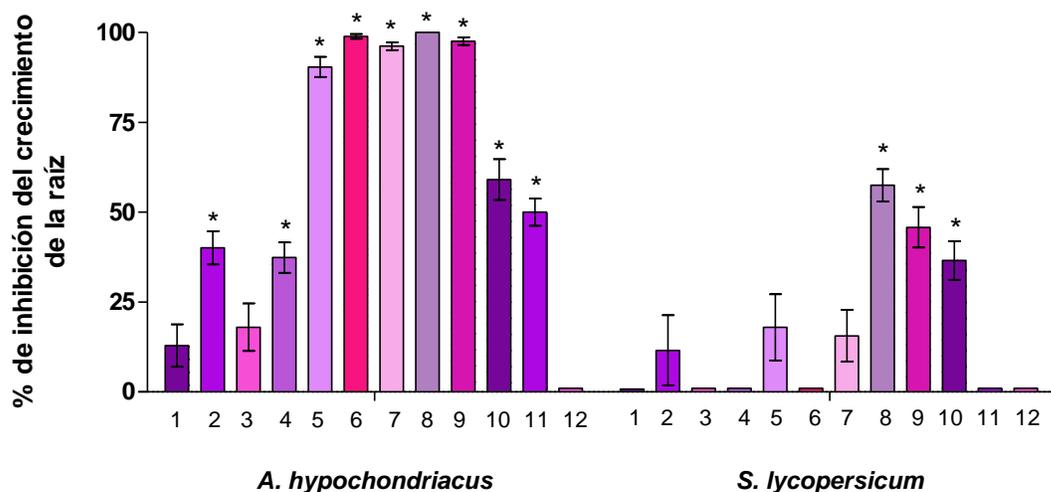
Gráfica 11. Actividad fitotóxica del medio de cultivo y micelio de los extractos orgánicos derivados del cultivo en mediana escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

Los resultados obtenidos de la evaluación biológica permitieron establecer que las condiciones de cultivo en mediana escala indujeron la producción de una mayor concentración de los metabolitos bioactivos o la producción de otros metabolitos que no se encontraban en los cultivos en pequeña escala. Por otro lado, la diferencia observada en la actividad biológica entre el extracto del medio de cultivo y del micelio es debida a que la composición química de los extractos orgánicos es diferente (Figura 11), en consecuencia,

y con el fin de aislar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica se realizó el fraccionamiento químico biodirigido del extracto del medio de cultivo.

10. Fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo del medio de cultivo en mediana escala de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo del medio de cultivo permitió la obtención de 12 fracciones primarias (Cuadro 5). En la Gráfica 12 se muestra la actividad biológica, evaluada sobre la germinación y el crecimiento de la raíz de semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum* a la concentración de 100 µg/mL. La actividad fitotóxica sobre *A. hypochondriacus* se concentra en las fracciones 2 y de la 4-11, y la de las semillas de *S. lycopersicum* en las fracciones 8-10. La fracción 8 es la más activa, inhibiendo la germinación y el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* en 100% e inhibiendo en un 45.8% el crecimiento de la raíz de las semillas de *S. lycopersicum*.



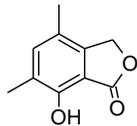
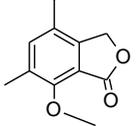
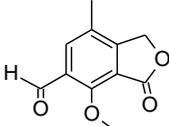
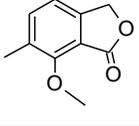
Gráfica 12. Efecto fitotóxico de las fracciones primarias sobre el crecimiento de la raíz de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Solanum lycopersicum*. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$).

10.1. Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en la fracción primaria activa 4

El fraccionamiento químico de la fracción primaria activa 4, utilizando diversos procedimientos cromatográficos (CC y CCFP), permitió el aislamiento y purificación de cuatro isobenzofuranonas; la 7-hidroxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (**28**), la 7-metoxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (**29**), la 6-formil-4-metil-7-metoxi-3H-

isobenzofuran-1-ona (**30**) y la 7-metoxi-6-metil-3H-isobenzofuran-1-ona (**31**). El compuesto **31** constituye un producto natural novedoso. En el Cuadro 25 se muestran las estructuras de las 4 isobenzofuranonas aisladas, su rendimiento y las fracciones de las cuales fueron purificadas.

Cuadro 25. Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

Metabolito secundario	Rendimiento (µg/L)	Fracciones
7-hidroxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (28) 	131.4 µg/L	4, 4-V,4-VI
7-metoxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (29) 	142.8 µg/L	4, 4-VII, 4-VIII
6-formil-4-metil-7-metoxi-3H-isobenzofuran-1-ona (30) 	171.4 µg/L	4, 4-VIII y 4-IX
7-metoxi-6-metil-3H-isobenzofuran-1-ona (31) 	322.8 µg/L	4

10.2. Caracterización de los metabolitos secundarios presentes en la fracción activa 4

Los cuatro metabolitos aislados presentan como característica estructural una γ -butirolactona fusionada con un anillo de benceno, por lo que se denominan isobenzofuran-1(3H)-onas o ftalidas (Teixeira et al. 2014).

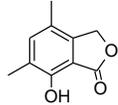
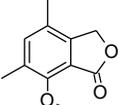
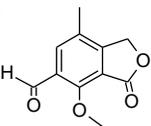
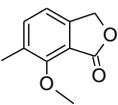
Los compuestos **28** - **31** se aislaron como sólidos incoloros cristalinos solubles en CH₂Cl₂. Su

elucidación estructural se llevó a cabo utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas y de difracción de Rx.

Los espectros en el IR de los compuestos **28** - **31** presentan bandas de absorción asociadas al grupo éster de la γ -butirolactona ($\nu_{\max} \sim 1740 \text{ cm}^{-1}$). El espectro del compuesto **28** presenta las bandas de absorción correspondientes a un grupo hidroxilo y otra para el grupo fenol ($\nu_{\max} = 3422.19$ y 1259.97 cm^{-1}). Para los compuestos **28** - **31** se observaron bandas asociadas a los grupos metoxilo ($\nu_{\max} = 2850.89$, 2848.70 y 2945.45 cm^{-1}) y éter ($\nu_{\max} = 1088.94$, 1105.67 y 1029.27) y, para el compuesto **30**, una banda que pertenece a un grupo aldehído ($\nu_{\max} = 1689.98 \text{ cm}^{-1}$) (Cuadro 26).

La fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas de alta resolución. Los espectros de masas de los compuestos **28** - **31** presentaron un ion molecular en una relación masa carga (m/z) de 178, 192, 206 y 178, respectivamente, y permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$, $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$ y $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, respectivamente (Cuadro 26).

Cuadro 26. Constantes espectroscópicas de IR y espectrométricas EM-IE (m/z) de las isobenzofuranonas **28** - **31**

Metabolito	IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$	EM-IE (m/z)
28 	3422.19 (-OH), 1731.98 (R-CO-OR), 1259.97 (-OH fenol)	178 [M^+ (83.2)], 160 (25.2), 149 (100), 133 (4.5), 121 (8.3), 103 (6.8)
29 	2850.89 ($\text{CH}_3\text{-O-R}$), 1745.43 (R-CO-OR), 1088.94 (R-O-R)	192 [M^+ (78.6)], 174 (32.8), 163 (87.1), 146 (100), 133 (15), 119 (18.6), 105 (20.7), 91 (21.4)
30 	2848.70 ($\text{CH}_3\text{-O-R}$), 1750.89 (R-CO-OR), 1689.98 (H-CO-R), 1105.67 (R-O-R)	206 [M^+ (44.6)], 188 (64.5), 176 (100), 160 (35.4), 149 (35.4), 132 (21.2), 105 (36.8), 91 (23.4)
31 	2945.45 ($\text{CH}_3\text{-O-R}$), 1740.85 (R-CO-OR), 1029.27 (R-O-R)	178 [M^+ (60.6)], 160 (35.9), 149 (71.6), 132 (100), 121 (21.1), 91 (28.8)

Los espectros de RMN unidimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) permitieron asignar la estructura de los compuestos **28** – **31**, y establecer que presentan un núcleo de isobenzofuran-1(3*H*)-ona. A continuación, se detallan las características de los espectros:

El espectro de RMN- ^{13}C (Figura 12) de la isobenzofuranona **28** muestra señales para 10 átomos de carbono. A campo alto se aprecian dos señales en δ_{C} 14.5 y 16.6 que corresponden a dos carbonos de metilo (CH_3 -4 y CH_3 -6), la señal en δ_{C} 69.9 corresponde a un carbono de un metileno (C-3) unido al oxígeno del anillo de la isobenzofuranona. A campo bajo se aprecia una señal en δ_{C} 173.2 que corresponde a un carbonilo de cetona (C-1), en la región aromática (δ_{C} 100-160 ppm) se aprecian señales para seis carbonos aromáticos que corresponden a carbonos cuaternarios δ_{C} 110.0 (C-7a), 142.1 (C-3a), 124.9 (C-4), 139.0 (C-5), 122.4 (C-6) y 152.5 (C-7), este último unido a función oxigenada (-OH).

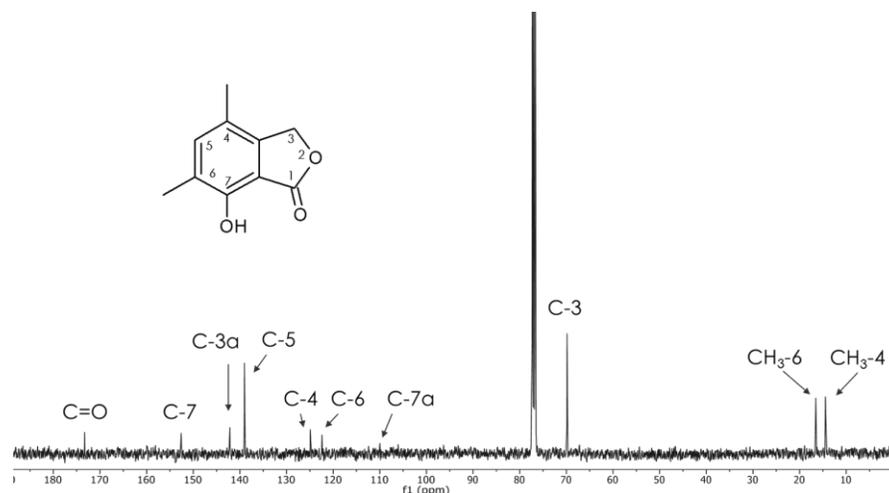


Figura 12. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la isobenzofuranona **28**.

El espectro de RMN- ^1H (Figura 13) muestra dos señales simples a campo alto para protones de metilos en δ_{H} 2.26 (CH_3 -4) y 2.21 (CH_3 -6). En δ_{H} 5.21 se observa una señal simple que integra para dos hidrógenos y que corresponde a los protones de un metileno (CH_2 -3). En la región de protones aromáticos (campo bajo δ_{H} 6-9 ppm) se observan dos señales simples que integran para un hidrógeno en δ_{H} 7.20 (H-5) y en δ_{H} 7.68 (OH-7), esta última corresponde a un protón de un grupo hidroxilo sobre anillo aromático. La estructura del

compuesto **28** fue confirmada inequívocamente por análisis de difracción de rayos X del monocristal (Figura 14).

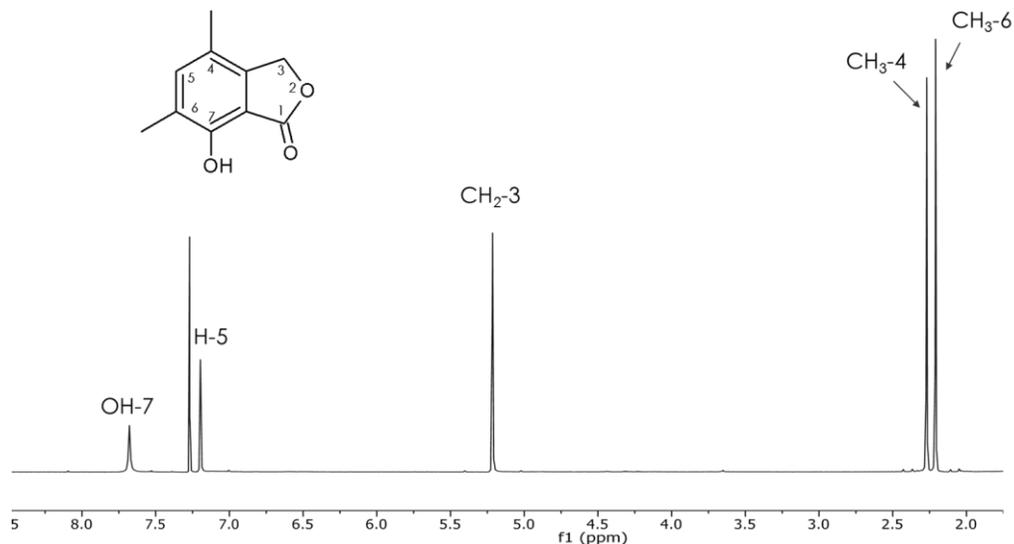


Figura 13. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) de la isobenzofuranona **28**.

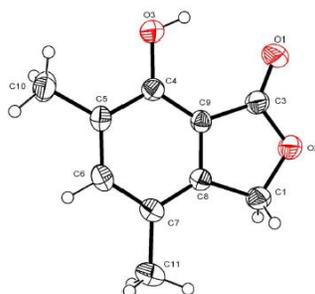


Figura 14. Estructura del compuesto **28**, la 7-Hidroxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona, obtenida a través de difracción de Rayos X.

Con respecto a la isobenzofuranona **29**, el espectro de RMN-¹³C (Figura 15) muestra señales para 11 átomos de carbono, a diferencia del espectro del compuesto **28**, presenta una señal adicional en δ_c 62.1 que corresponde a un metoxilo (CH₃O-7), y en el espectro de RMN-¹H (Figura 16) se observa una señal simple en δ_H 4.03 que integra para los tres hidrógenos del metoxilo.

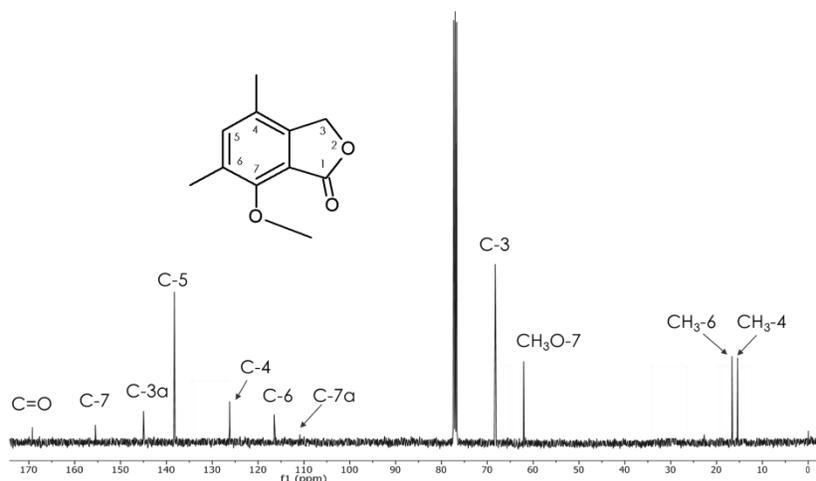


Figura 15. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de la isobenzofuranona **29**.

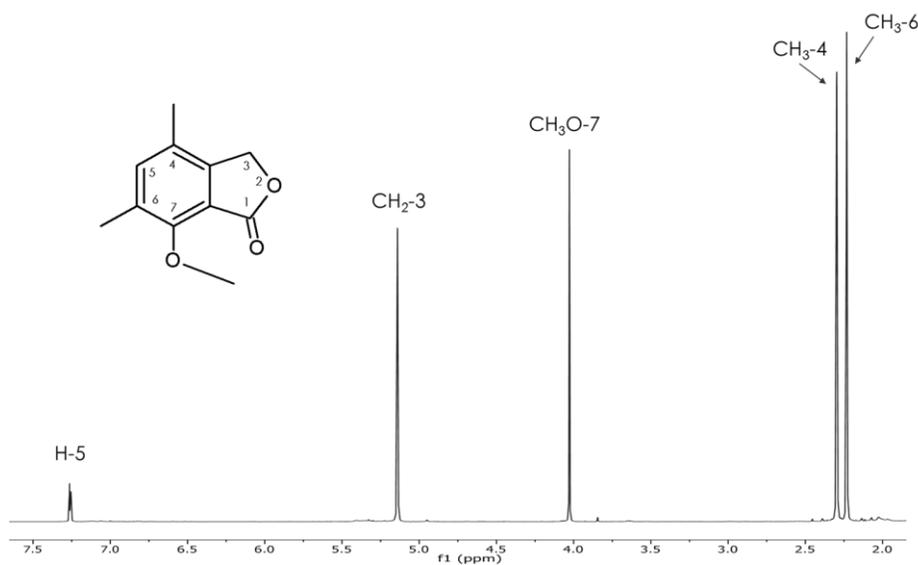


Figura 16. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) de la isobenzofuranona **29**.

El espectro de RMN-¹³C (Figura 17) de la isobenzofuranona **30** muestra señales para 11 átomos de carbono, donde la única diferencia con respecto al espectro del compuesto **29** es la ausencia de la señal en δ_c 16.6 en espectro de RMN-¹³C asignada al metilo CH₃-6, en su lugar se aprecia la presencia de una señal en δ_c 190.2 que corresponde a un carbonilo de aldehído (CHO-6). En el espectro de RMN-¹H (Figura 18) del compuesto **30** se observa la presencia de una señal simple en δ_H 10.01 que integra para un hidrógeno y que corresponde

al protón del aldehído (CHO-6) y la ausencia de la señal simple en δ_H 2.24 asignada al protón del metilo (CH_3 -6).

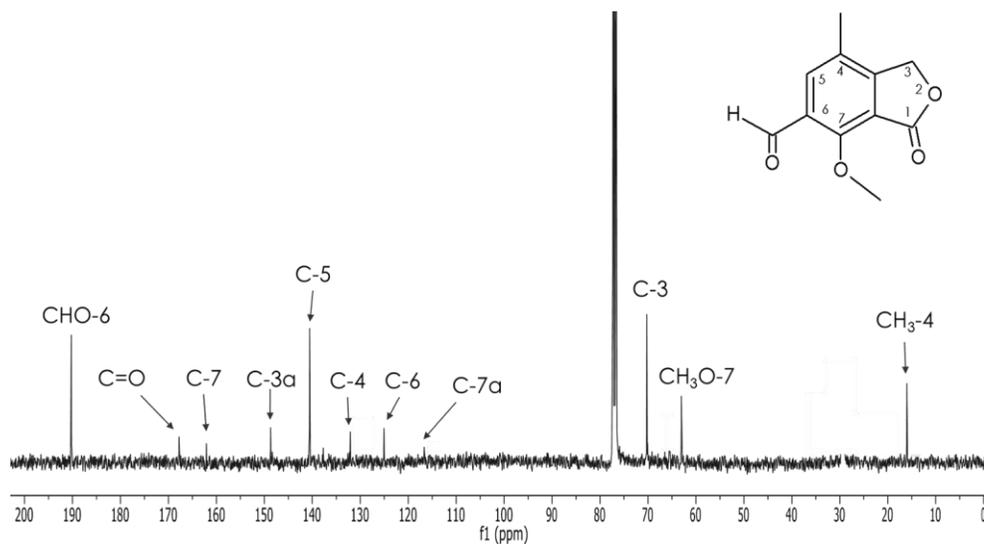


Figura 17. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de la isobenzofuranona **30**.

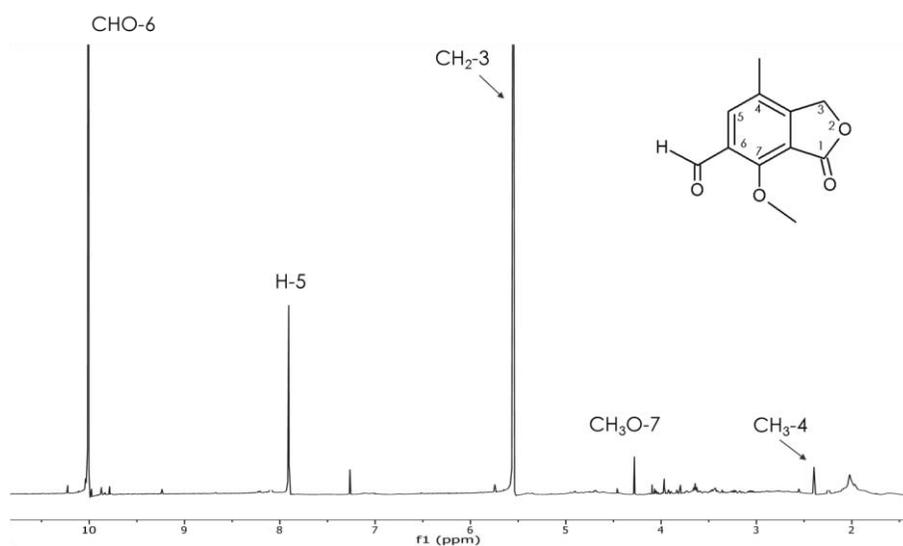


Figura 18. Espectro de RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) de la isobenzofuranona **30**.

El espectro de RMN- ^{13}C (Figura 19) de la isobenzofuranona **31** muestra señales para 10 átomos de carbono, donde la única diferencia con el compuesto **29** es la ausencia de la señal en δ_c 15.4 en espectro de RMN- ^{13}C , asignada al grupo metilo de la posición CH_3 -4 y la

ausencia en el espectro de RMN- ^1H (Figura 20) de una señal simple en δ_{H} 2.30 que integra para tres hidrógenos asignados a los protones del metilo antes mencionados ($\text{CH}_3\text{-4}$). En su lugar se aprecia la presencia en espectro de RMN- ^1H de dos señales dobles *orto* acopladas en δ_{H} 6.86 (H-4, $J = 8.3$ Hz) y δ_{H} 7.39 (H-5, $J = 8.3$ Hz).

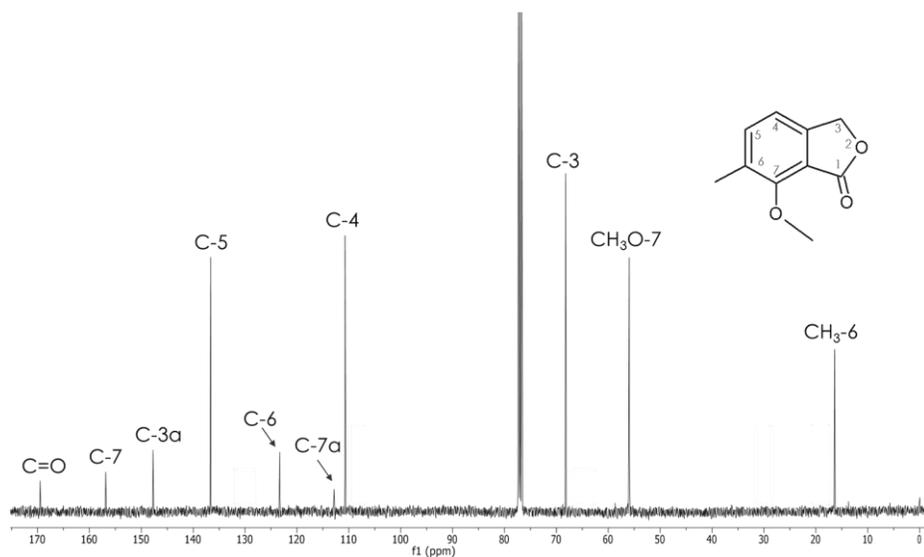


Figura 19. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la isobenzofuranona **31**.

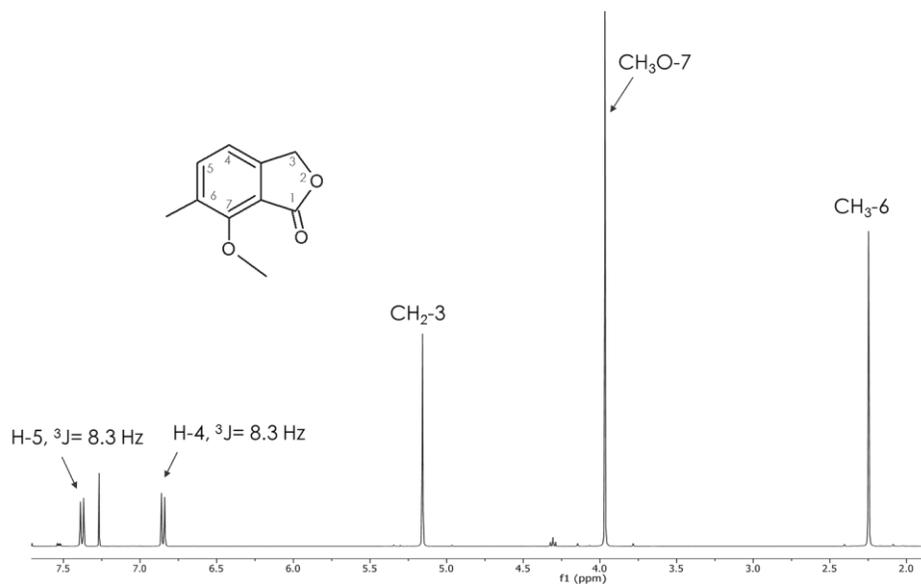
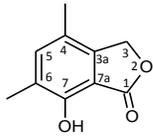
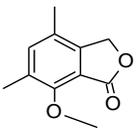
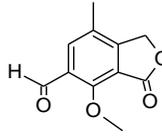
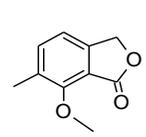


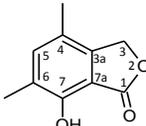
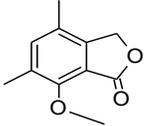
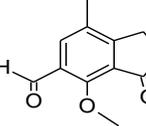
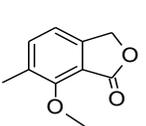
Figura 20. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) de la isobenzofuranona **31**.

El análisis espectroscópico y espectrométrico anterior permitió establecer la estructura química de los compuestos **28** - **31** como, la 7-hidroxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**28**), la 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**), la 6-formil-4-metil-7-metoxi-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**30**) y la 7-metoxi-6-metil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**31**). En los Cuadros 27 y 28 se muestran los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos aislados.

Cuadro 27. Datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de las isobenzofuranonas **28** - **31**

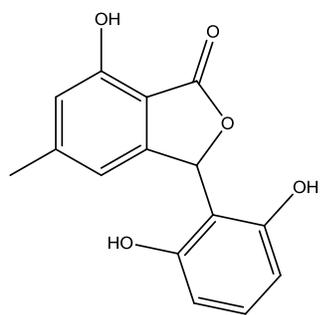
Posición	^{13}C (δ)			
	28 	29 	30 	31 
1	173.2	169.2	167.7	169.5
2	---	---	---	---
3	69.9	68.2	70.3	68.2
3a	142.1	145.0	148.6	147.7
4	124.9	126.2	132.0	110.7
5	139.0	138.2	140.5	136.6
6	122.4	116.4	125.0	123.3
7	152.5	155.5	162.0	156.8
7a	110.0	110.8	116.6	112.8
HO-7	---	---	---	---
CH₃O-7	---	62.1	63.1	55.9
CH₃-4	14.5	15.4	16.0	---
CH₃-6	16.6	16.6	---	16.3
CHO-6	---	---	190.2	---

Cuadro 28. Datos espectroscópicos de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) de los compuestos **28-31**

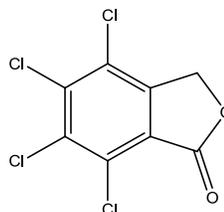
Posición	^1H (δ , mult., J en Hz)			
	28 	29 	30 	31 
1	---	---	---	---
2	---	---	---	---
3	5.22 (s)	5.10 (s)	5.55 (s)	5.16 (s)
3a	---	---	---	---
4	---	---	---	6.86 (d, $J=8.3$)
5	7.20 (s)	7.26 (s)	7.91 (s)	7.39 (d, $J=8.3$)
6	---	---	---	---
7	---	---	---	---
7a	---	---	---	---
OH-7	7.67 (s)	---	---	---
CH₃O-7	---	4.03 (s)	4.28 (s)	3.97 (s)
CH₃-4	2.26 (s)	2.30 (s)	2.40 (s)	---
CH₃-6	2.21 (s)	2.24 (s)	---	2.25 (s)
CHO-6	---	---	10.01 (s)	---

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos **28-31** están en armonía con los descritos previamente en la literatura. La 7-hidroxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (**28**) fue aislada previamente de *Diaporthe phaseolorum* (Wang et al. 2006), *Penicillium gladioli* (Grove 1952) y *Penicillium megasporum* (Nozawa et al. 1989). Este compuesto posee actividad citotóxica con la línea celular Raji (CI_{50} 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), actividad anti-oxidante (CI_{50} 61.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y actividad antifúngica contra *Penicillium avellaneum* (CI_{50} 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Wang et al. 2006). La 7-metoxi-4,6-dimetil-3H-isobenzofuran-1-ona (**29**) fue aislada anteriormente de *Diaporthe* sp. (Lin et al. 2005; Wang et al. 2003) y posee actividad citotóxica con las líneas celulares KB y Raji con una IC_{50} de 59.6 y 8.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, y actividad antifúngica contra *Alternaria alternata*, MIC 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lin et al. 2005). Asimismo, la 6-formil-4-metil-7-metoxi-3H-isobenzofuran-1-ona (**30**) o diaportelactona fue aislada previamente de *Diaporthe* sp. y posee actividad citotóxica en las líneas celulares KB y Raji con una IC_{50} de 6.25 y 5.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, y actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, MIC de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lin et al. 2005).

Asimismo, se han aislado otros productos naturales con núcleo de isobenzofuranona como la isopestacina (**32**) de *Pestalotiopsis microspora* con propiedades antifúngica contra *P. ultimum*, al cual inhibe completamente su crecimiento a 40 µg/mL, además posee propiedades antioxidantes (Strobel et al. 2002). Por otro lado, el compuesto comercial Fthalide® (**33**), el cual es una isobenzofuranona con propiedades antifúngicas que inhibe la producción de melaninas (Aliferis & Jabaji 2011).



(32)



(33)

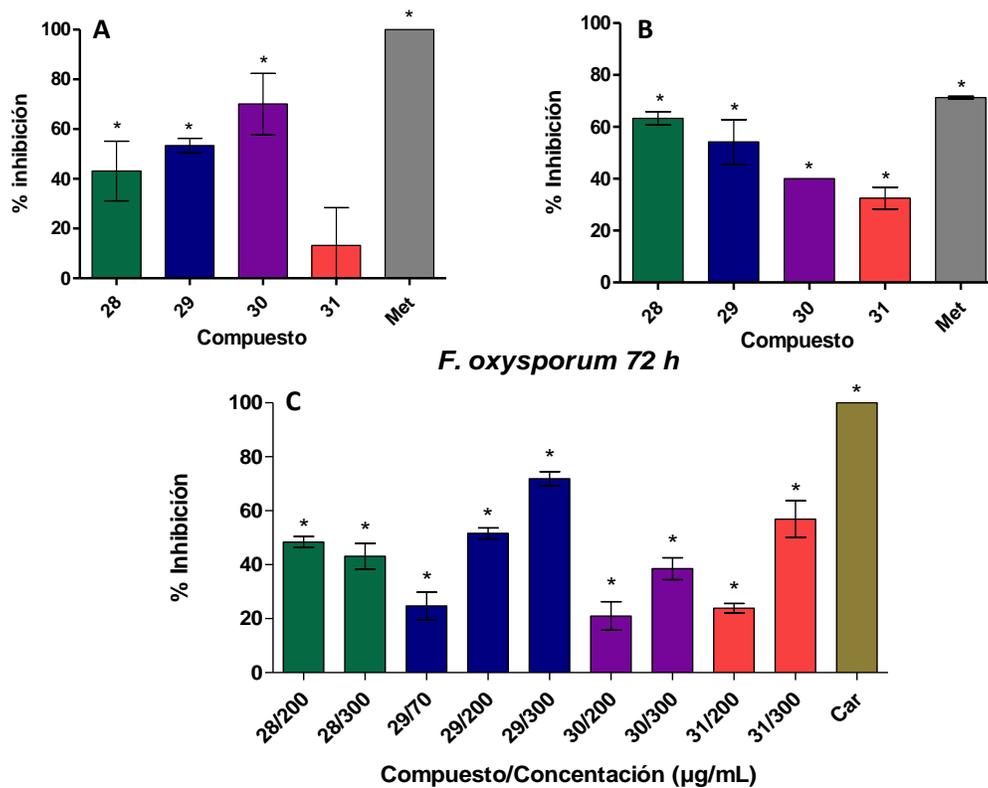
La actividad biológica demostrada previamente sobre las isobenzofuranonas aisladas, aunada a la actividad antifúngica demostrada por el extracto orgánico del medio de cultivo del endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, nos llevó a evaluar a las isobenzofuranonas sobre el crecimiento de los hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia económica en la agricultura.

11. Determinación cuantitativa de la actividad antifúngica de las isobenzofuranonas aisladas

En la Gráfica 13 se observa la actividad antifúngica de las cuatro isobenzofuranonas. Los compuestos **28**, **29** y **30** inhibieron significativamente el crecimiento del oomiceto *P. aphanidermatum* a las 24 h. Del mismo modo, los 4 metabolitos secundarios inhibieron significativamente el crecimiento de *Ph. capsici* a las 24 h. El hongo *F. oxysporum* fue inhibido significativamente por las 4 isobenzofuranonas, mostrando el mayor efecto a las 72 h con los compuestos **28** y **29**. La mayor inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* fue observada a los tres días. Con base en los bioensayos de potencial antioomiceto y

antifúngico, la isobenzofuranona **29** es el metabolito secundario producido por el endófito *Nodulisporium* sp. que posee la mayor actividad antimicrobiana.

Debido a que las cuatro isobenzofuranonas se obtuvieron en rendimientos bajos (Cuadro 25), sólo fue posible determinar la CI_{50} sobre el crecimiento del hongo *F. oxysporum*. Los valores de CI_{50} para los compuestos **28** y **30** son mayores a $300 \mu\text{g/mL}$ (1.68 y 1.45 mM, respectivamente). El compuesto **29**, presenta una CI_{50} de 1.04 mM ($\sim 200 \mu\text{g/mL}$), corroborando su potencial antimicrobiano. Para establecer la CI_{50} de cada compuesto aislado sobre todos los microorganismos fitopatógenos y plantas blanco, actualmente se están obteniendo cantidades adicionales por métodos de síntesis.



Gráfica 13. Actividad biológica de los compuestos **28** - **31**. **A.** Inhibición sobre el crecimiento de *P. aphanidermatum* a la concentración de $200 \mu\text{g/mL}$ (~ 1 mM). **B.** Inhibición sobre el crecimiento de *Ph. capsici* a la concentración de $200 \mu\text{g/mL}$. **C.** Inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* a diferentes concentraciones. Controles positivos: metalaxil-M (Met) y carbendazim (Car) a $200 \mu\text{g/mL}$. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.05$).

Cabe destacar que los compuestos **28**, **29** y **30** provocaron cambios morfológicos en las colonias de los tres fitopatógenos de prueba (Figura 21). La isobenzofuranona **29** provocó cambios morfológicos en las colonias de los tres microorganismos, disminuyendo la densidad del micelio de *P. aphanidermatum* y modificando la morfología de sus hifas. Los compuestos **28** y **30** inhibieron la formación de pigmentos en *F. oxysporum*, y el compuesto **29** provocó la formación de anillos en la colonia. Con respecto a *Ph. capsici*, se observa que el compuesto **29** inhibió su crecimiento y modificó la forma y densidad de las hifas de su micelio.

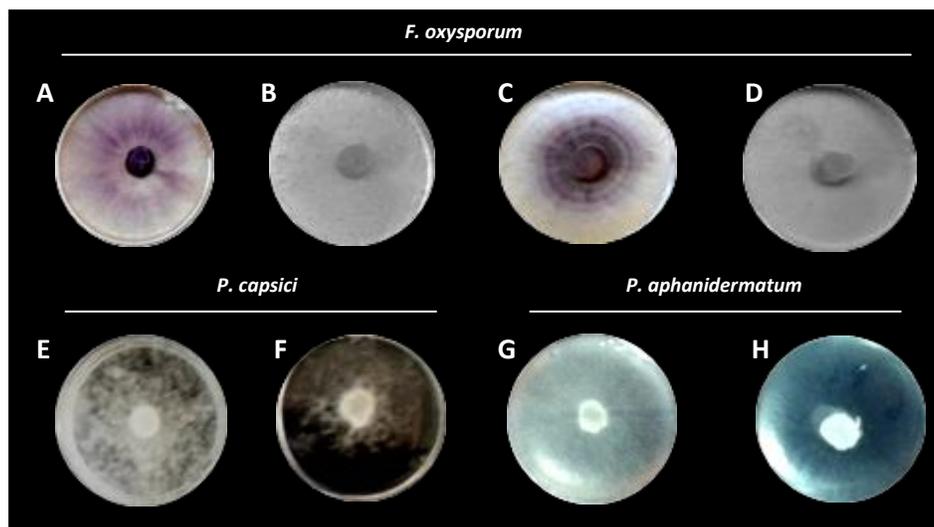


Figura 21. Cambios morfológicos en las colonias de los fitopatógenos provocados por las isobenzofuranonas **28-30**. Colonia de *Fusarium oxysporum*: **A**. Control, **B**. Tratamiento con **28**, **C**. Tratamiento con **29**, **D**. Tratamiento con **30**. Colonia de *Phytophthora capsici*: **E**. Control, **F**. Tratamiento con **29**. Colonia de *Pythium aphanidermatum*: **G**. Control, **H**. Tratamiento con **29**.

Con el fin de observar si hubo cambios a nivel microscópico en las hifas de los micelios y de explorar el posible modo de acción de los compuestos puros se realizaron preparaciones microscópicas de las colonias. En la Figura 22 se observa que la isobenzofuranona **29** provoca la ausencia de vacuolas en las hifas de *P. aphanidermatum*, y permitió el paso del colorante, indicando que este compuesto podría estar interfiriendo con el metabolismo y la permeabilidad de la pared y/o membrana celular del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*. Asimismo, disminuyó la presencia de vacuolas en *P. capsici*. En todos los casos se midió el grosor de las hifas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos.

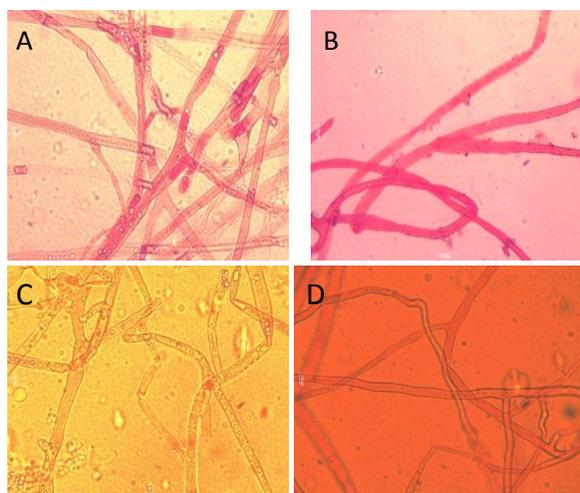


Figura 22. Preparación microscópica del micelio de *Pythium aphanidermatum* teñido con Rojo Congo, x400. **A.** Control. **B.** Tratamiento con la isobenzofuranona **29** a la concentración de 200 µg/mL. Preparación microscópica del micelio de *Phytophthora capsici* teñido con Rojo Congo, x400. **C.** Control. **D.** Tratamiento con el Compuesto **29** a la concentración de 200 µg/mL.

La 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**), a pesar que presenta menor actividad que los controles positivos a la misma concentración de prueba, podría considerarse como un candidato para su uso en el control de hongos y oomicetos fitopatógenos en la agricultura, aunado a que provoca cambios morfológicos que no se presentaron con los controles positivos (agroquímicos). De manera adicional, el compuesto **29**, al ser una molécula pequeña y sencilla, se podría sintetizar fácilmente o usar como base para la síntesis de otras moléculas con mayor actividad biológica.

12. Cultivos en medios PDA y MA de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en interacción con *P. aphanidermatum*

Con la finalidad de establecer si la producción del pigmento color amarillo observado durante las interacciones antagónicas en los bioensayos de antagonismo directo simple entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los microorganismos fitopatógenos de prueba, particularmente con *P. aphanidermatum*, es debida a la presencia de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, se obtuvieron cultivos en interacción entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y *P. aphanidermatum* en medio PDA y MA. Bajo estas

condiciones de cultivo la producción del pigmento amarillo fue mayor a las tres semanas de incubación (Figura 23).

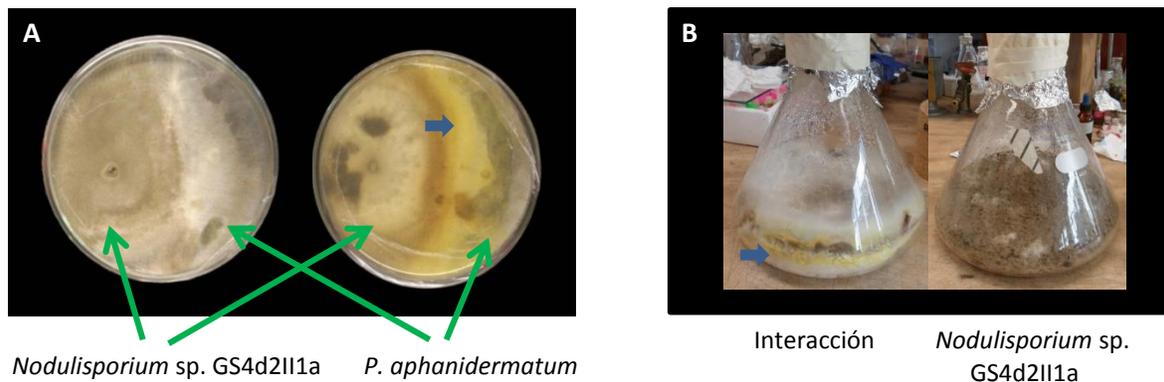


Figura 23. Interacciones antagónicas a las tres semanas en medio agar papa-dextrosa, PDA, (A) y en medio arroz, MA, (B).

El pigmento amarillo puede estar constituido por metabolitos secundarios hidrosolubles coloridos o debido a la producción de enzimas. La presencia de pigmentos se ha relacionado con la producción de VOCs y el cambio en el metabolismo (Hynes et al., 2007).

Adicionalmente, se realizaron preparaciones microscópicas de la zona de interacción antagónica en el cultivo en PDA (Figura 24), donde se observó que las hifas de *P. aphanidermatum* tienen forma irregular y una gran cantidad de vacuolas, lo cual indica que hay interferencia hifal por parte de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, que daña a las células del competidor, principalmente por la acción de metabolitos secundarios (Boddy 2000). Estos resultados demuestran que los metabolitos presentes en la interacción antagónica inhiben al competidor por un mecanismo diferente al presentado por la isobenzofuranona **2**, debido a que se observó mayor cantidad de vacuolas y no la ausencia de estas. Probablemente los compuestos producidos en estas condiciones de cultivo son diferentes a los que se producen en CPD.

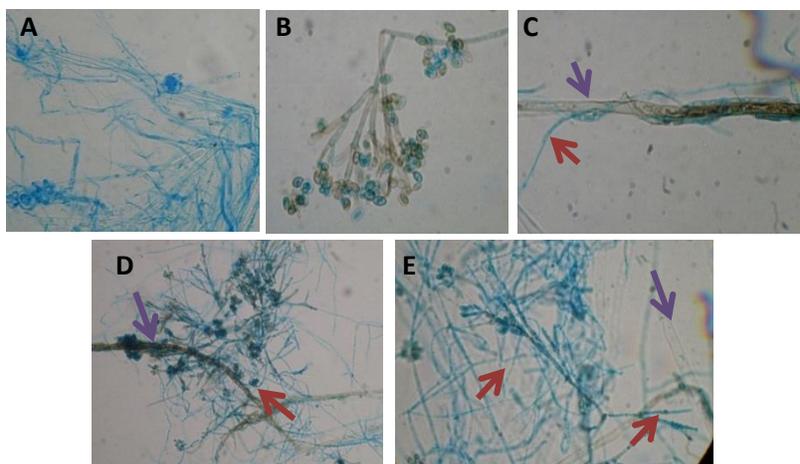


Figura 24. A. Control *P. aphanidermatum*. B. Control *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. C-E. Zona de interacción antagonica. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (flechas moradas) y *P. aphanidermatum* (flechas rojas). Tinción con azul de lactofenol, x 400.

En el Cuadro 29 se muestran los rendimientos de los extractos de los cultivos en PDA y MA, observándose que el rendimiento obtenido en MA es mayor que el que se obtiene en cultivos en PDA para el hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, donde se obtiene alrededor de 90 mg/L. En la Figura 25 se muestra la CCF comparativa entre los extractos de los cultivos control de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los de interacción antagonica en MA, donde se observa que los perfiles cromatográficos son muy similares, sin embargo, en el extracto de la interacción se observa un metabolito de color amarillo que no se encuentra presente en los controles de crecimiento, y que probablemente corresponda al pigmento amarillo que se observa claramente en los cultivos en interacción. Los extractos derivados de los cultivos en PDA no revelaron en CCF diferencia entre ellos.

En el Cuadro 30 se muestra la actividad biológica de los extractos obtenidos de los cultivos en medio MA y PDA. Los extractos de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y los obtenidos en interacción antagonica no tuvieron actividad biológica significativa, sin embargo, las fracciones metanólicas (sólido) y hexánicas (aceite) del extracto de MA inhibieron significativamente el crecimiento de las semillas de *A. hypochondriacus* y *S. lycopersicum*, y estimularon el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos. Estas observaciones son contrarias a las esperadas. Es de esperarse que los extractos derivados de la interacción antagonica tuvieran actividad antifúngica, debido a que los extractos *Nodulisporium* sp.

GS4d2II1a en CPD inhiben significativamente el crecimiento de *P. aphanidermatum*. Igualmente el endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a inhibe significativamente su crecimiento en los bioensayos de antagonismo directo. Por lo que el o los compuestos presentes en el pigmento amarillo observado en la zona de interacción antagónica y detectado en la CCF comparativa (Figura 25), tal vez no sean los responsables de la actividad antifúngica, que media la interacción de antagonismo establecida entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y *P. aphanidermatum*. Estos compuestos pueden tener otra función o su actividad biológica puede verse enmascarada por la presencia de los componentes mayoritarios del extracto o fracción. Con respecto al extracto de *P. aphanidermatum*, éste tuvo actividad fitotóxica como se ha reportado anteriormente (Zhang et al. 2010) y estimuló el crecimiento de *F. oxysporum* y *A. solani*.

Cuadro 29. Rendimiento de los extractos de cultivos en agar papa-dextrosa (PDA) y medio arroz (MA) de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y en interacción antagónica con *Pythium aphanidermatum*

Cultivo	Condiciones de cultivo	Extracto	Rendimiento (mg/50 mL PDA ó g/300 g Arroz)	Rendimiento partición (g/300 g Arroz)
<i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	MA	CH ₂ Cl ₂ y AcOEt	2.5152	Hex 2.4050 MeOH 0.1102
	PDA	CH ₂ Cl ₂	51.2200	-
Interacción antagónica	MA	CH ₂ Cl ₂	2.1176	Hex 1.9695 MeOH 0.0333
	PDA	CH ₂ Cl ₂	47.2200	-
<i>P. aphanidermatum</i>	MA	CH ₂ Cl ₂ y AcOEt	0.2266	-
	PDA	CH ₂ Cl ₂	23.7100	-

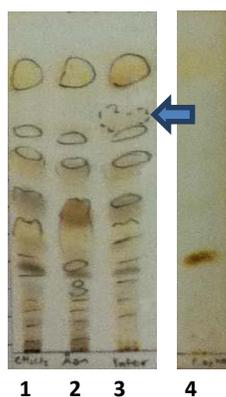


Figura 25. CCF comparativa de los cultivos en medio arroz (MA). 1. Extracto de CH₂Cl₂ de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a 2. Extracto de AcOEt de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a 3. Extracto de la interacción con *Pythium aphanidermatum*. 4. Extracto de *P. aphanidermatum*. Sistema de elución: CH₂Cl₂-MeOH 98:2. Revelador: H₂SO₄ al 10% / 80 °C.

Cuadro 30. Actividad antifúngica, antioomiceto y fitotóxica de los extractos de cultivos en medio arroz (MA) y agar papa-dextrosa (PDA) de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y en interacción antagonica con *Pythium aphanidermatum*

Cultivo	Condiciones de cultivo	Extracto	% Inhibición del crecimiento de la raíz	% Estimulación del crecimiento de hongos y oomicetos
<i>Nodulisporium</i> sp. GS4d2II1a	MA	Total	NA	NA
		Hex	A: 34.0 ± 3.7 * S: 47.3 ± 3.5 *	P: 16.6 ± 3.5*
		MeOH	A: 37.5 ± 1.7* S: 80.7 ± 3.4*	-
	PDA	Total	-	F: 23.3 ± 0.0* Al: 31.5 ± 0.0*
Interacción antagonica	MA	Total	NA	NA
		Hex	A: 24.7 ± 4.9*	F: 21.5 ± 1.5*
		MeOH	A: 59.4 ± 2.9* S: 62.6 ± 2.8*	-
	PDA	Total	-	F: 23.5 ± 0.0 * Al: 31.58 ± 0.0*
<i>P. aphanidermatum</i>	MA	Total	A: 72.7 ± 1.6* S: 74.4 ± 2.0 *	P: 19.4 ± 6.2*
	PDA	Total	-	F: 21.88 ± 2.3* Al: 28.29 ± 6.1*

NA: no hubo actividad biológica. A: *A. hypochondriacus*, S: *S. lycopersicum*, P: *Ph. parasitica*, F: *F. oxysporum*, Al: *A. solani*. (*) Los valores de inhibición de crecimiento son estadísticamente significativos, ANOVA ($P < 0.01$). – No se realizó su evaluación

13. Identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a.

La producción de compuestos orgánicos volátiles bioactivos se demostró a través de los bioensayos en cajas de Petri divididas. Sin embargo, los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos de prueba fue menor y en un menor número de microorganismos que la observada en los bioensayos de antagonismo directo simples y múltiples. Por otra parte, el extracto de CH_2Cl_2 del cultivo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en medio sólido empleando PDA no inhibió significativamente el crecimiento de los fitopatógenos; por lo que los metabolitos secundarios producidos en estas condiciones de cultivo y de extracción no tienen actividad antifúngica ni antioomiceto significativa. Estos resultados indican que la inhibición a distancia, observada en los bioensayos de

antagonismo múltiple, es debida a un efecto sinérgico entre metabolitos secundarios difusibles a través del medio de cultivo y a compuestos orgánicos volátiles producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a.

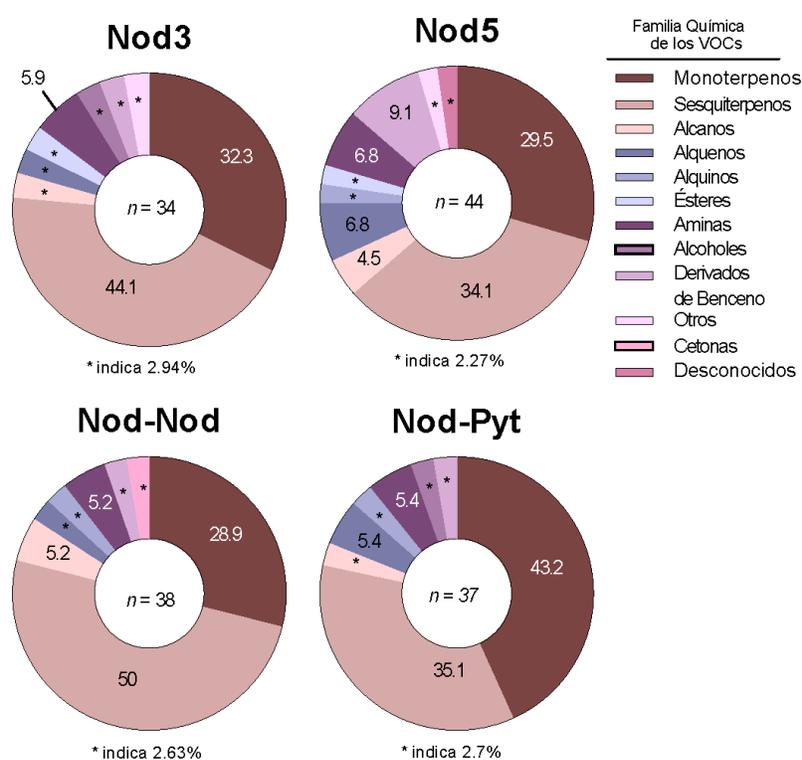
Además, la actividad antimicrobiana podría deberse a la mezcla de compuestos volátiles y no sólo de la actividad biológica de un solo compuesto. Se sabe que los VOCs actúan sinérgicamente para producir la actividad biológica, y que se pierde cuando actúan solos (Mulyaningsih et al. 2010; Sears et al. 2001; Strobel 2011). Por otro lado, la producción VOCs podría aumentar o cambiar en las interacciones antagónicas múltiples directas (interacción interespecífica). Por lo tanto, para verificar esta hipótesis se llevo a cabo la identificación de VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a mediante SPME acoplada a CG-EM en diferentes días de crecimiento, y en interacción inter e intra específica: 1) *Nodulisporium* sp. aislamiento GS4d2II1a de tres días de crecimiento (Nod3), 2) *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a de cinco días de crecimiento (Nod5), 3) *P. aphanidermatum* de dos días de crecimiento, 4) interacción antagónica intraespecíficas de cinco días de crecimiento de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, (Nod-Nod), y 5) interacción interespecífica de dos días de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a con *P. aphanidermatum* (Nod-Pyt).

De manera adicional, también se estableció la composición de los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en el extracto orgánicos del medio de cultivo y micelio.

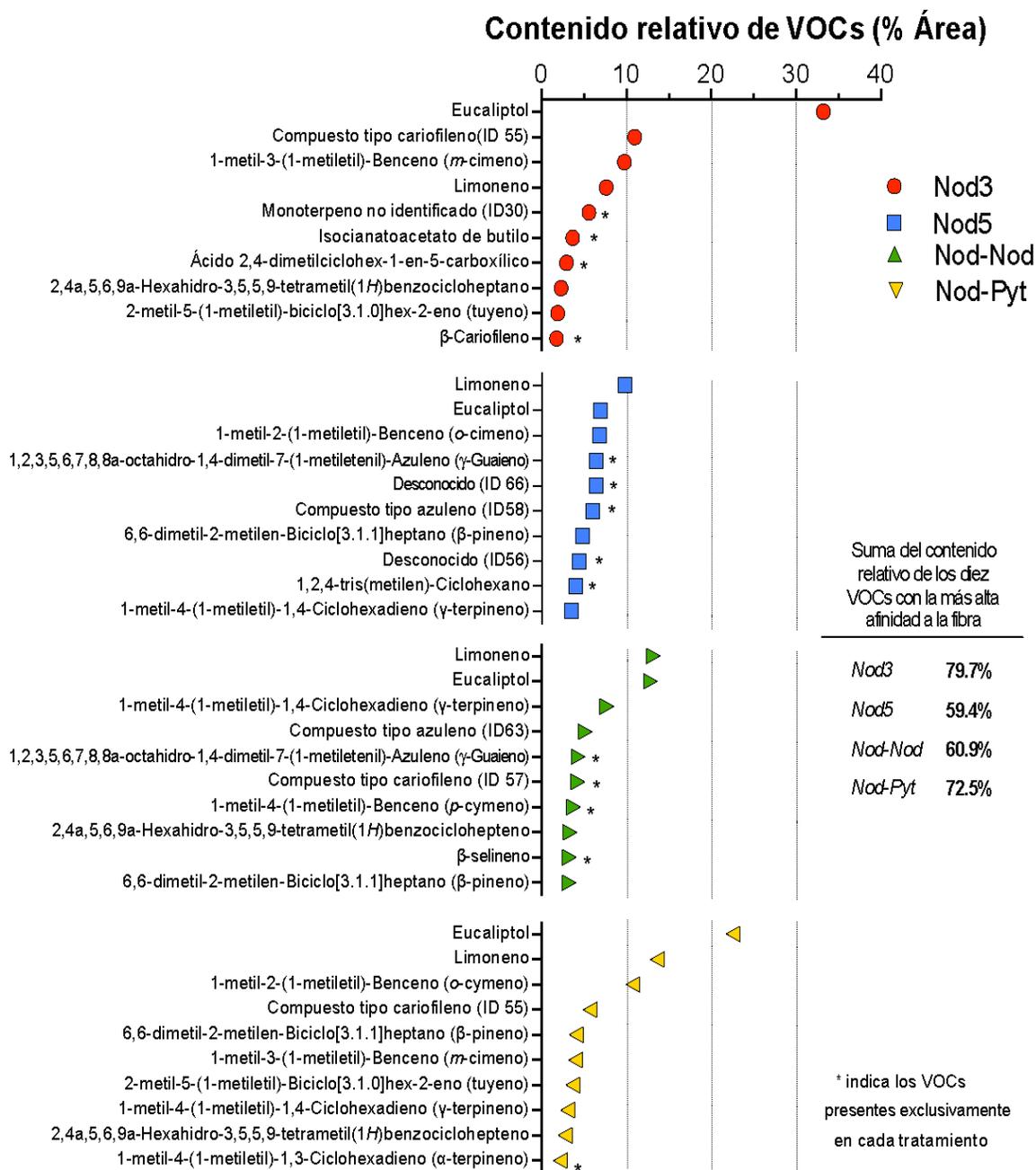
13.1. Identificación de los metabolitos volátiles en la fase de vapor (HS-SPME): similitudes y diferencias entre tratamientos

Al igual que otras especies de *Hypoxyylon* y *Nodulisporium*, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a produjo una mezcla de metabolitos secundarios volátiles cuando se cultivó *in vitro* durante tres (Nod3), y cinco (Nod5) días, en interacción interespecífica con *P. aphanidermatum* (Nod-Pyt), y en interacción intraespecífica con otro inóculo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (Nod-Nod). En total, se detectaron 70 metabolitos secundarios en cuatro de los cinco tratamientos (*P. aphanidermatum* no produjo VOCs). Los compuestos orgánicos volátiles producidos fueron principalmente terpenos (mono y sesquiterpenos) que representan el 63% del total. En particular, los monoterpenos fueron los más abundantes en la interacción Nod-Pyt y los sesquiterpenos en la interacción Nod-Nod. Los VOCs producidos en menor

proporción fueron alquenos, derivados del benceno, ésteres, alcanos, alquinos, aminas, cetonas, alcoholes y ácidos carboxílicos (Gráfica 14). En el Cuadro 31 se muestra el número total de metabolitos detectados y listados por índice de retención (RI). Por otra parte, en la Gráfica 15 se presentan los diez VOCs con mayor afinidad a la fibra en cada tratamiento, y su contenido relativo. Estos metabolitos representan el 79.7% en Nod3; 59.4% en Nod5; 60.9% en Nod-Nod; y, el 72.5% en Nod-Pyt del área total, donde el eucaliptol fue el compuesto con la mayor afinidad en Nod3 y Nod-Pyt, y el limoneno en Nod5 y Nod-Nod. Además, las diferencias entre los tratamientos fueron evidentes en los cuatro cromatogramas representativos, donde el número picos y sus áreas cambiaron (Figura 26).



Gráfica 14. Clasificación química de los metabolitos orgánicos volátiles producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y contenido relativo por tratamiento (%). *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a los tres días (Nod3), y cinco días (Nod5) de crecimiento, interacción intraespecífica (Nod-Nod) e interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt).



Gráfica 15. Los diez VOCs con la más alta afinidad a la fibra (% área) en los diferentes tratamientos: *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a los tres (Nod3), y cinco días (Nod5) de crecimiento, en interacción intraespecífica (Nod-Nod) e interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt).

Cuadro 31. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) identificados en *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado durante tres (Nod3) y cinco días (Nod5), en interacción intraespecífica (Nod-Nod) y en interacción interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt)

ID	Compuestos	PM	FM	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Area Total (%)				Identificación ^c
						Nod3	Nod5	Nod-Pyt	Nod-Nod	
1	amina no identificada	185		675.47	-	0.94	x	0.90	1.49	EM
2	amina no identificada	151		678.24	-	0.43	0.65	1.02	x	EM
3	1H-Pirazol	68	C ₃ H ₄ N ₂	680.50	-	X	1.06	X	x	EM
4	desconocido	89		680.55	-	X	1.02	X	x	EM
5	éster no identificado	142		688.32	-	X	3.02	X	x	EM
6	tetrahidro-3-metil-furano	86	C ₅ H ₁₀ O	690.18	-	X	2.27	X	x	EM
7	isocianatoacetato de butilo	157	C ₇ H ₁₁ NO ₃	691.68	-	3.66	x	X	x	EM
8	3-metil-1-butanol	88	C ₅ H ₁₂ O	746.93	747	0.04	x	X	x	EM, IK, EST
9	2-metil-1-butanol	88	C ₅ H ₁₂ O	752.24	756	X	x	0.01	x	EM, IK, EST
10	2-metil-5-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hex-2-eno (tuyeno)	136	C ₁₀ H ₁₆	904.82	930	1.89	1.51	3.69	2.68	EM, IK
11	3-carene	136	C ₁₀ H ₁₆	905.85	1008	X	1.80	X	x	EM, IK
12	1,2,4-tris(metilen)-ciclohexano	120	C ₉ H ₁₂	917.32	-	X	4.02	X	x	EM
13	metoxibenceno	108	C ₇ H ₈ O	928.64	917	0.02	0.10	X	x	EM, IK
14	3-ethyliden-2-metil-1-hexen-4-ino	120	C ₉ H ₁₂	935.40	-	X	0.09	0.08	x	EM
15	4-metilen-1-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hexano (sabineno)	136	C ₁₀ H ₁₆	956.00	962	0.17	x	0.08	0.09	EM, IK
16	2,6-dimetil-2,6-octadieno	138	C ₁₀ H ₁₈	973.80	990	0.02	0.18	0.19	x	EM, IK
17	α-mirceno	136	C ₁₀ H ₁₆	981.00	990	1.75	x	X	3.07	EM, IK
18	6,6-dimetil-2-metilen-biciclo[3.1.1]heptano (β-pineno)	136	C ₁₀ H ₁₆	983.20	979	X	4.83	4.06	3.23	EM, IK, EST

^aIR_{exp}: índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. ^bIR_{lit}: índices de Kovats de la literatura (Adams, 2007; NIST). ^cIdentificación por comparación con EM: espectros de masas, IK: índices de Kovats de la literatura, EST: estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich (≥98% de pureza). (-) El índice de Kovats no está reportado en una columna capilar DB-5MS. (x) El compuesto no fue detectado en el tratamiento.

Cuadro 31. VOCs identificados en *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado durante tres (Nod3) y cinco días (Nod5), en interacción intraespecífica (Nod-Nod) y en interacción interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt) (Continuación)

ID	Compuestos	PM	FM	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Area Total (%)				Identificación ^c
						Nod3	Nod5	Nod-Pyt	Nod-Nod	
19	2-pentilfurano	138	C ₉ H ₁₄ O	989.60	988	0.11	0.16	0.19	0.32	EM, IK
20	5-metilencicloocta-1,3-dieno	120	C ₉ H ₁₂	995.00	-	X	0.12	0.15	0.68	EM
21	α-felandreno	136	C ₁₀ H ₁₆	999.00	1002	0.41	0.54	1.85	2.27	EM, IK
22	indano	118	C ₉ H ₁₀	1005.20	1028	X	x	x	0.15	EM, IK
23	1-etenil-2-metil-benceno	118	C ₉ H ₁₀	1005.90	-	X	0.12	x	x	EM
24	1-metil-4-(1-metiletil)-1,3-ciclohexadieno (α-terpineno)	136	C ₁₀ H ₁₆	1012.60	1017	0.64	2.87	2.20	2.58	EM, IK, EST
25	2-metil-5-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol	152	C ₁₀ H ₁₆ O	1012.70	1039	X	1.06	x	x	EM, IK
26	4-careno	136	C ₁₀ H ₁₆	1018.20	1014	X	x	1.18	x	EM, IK
27	amina no identificada	149	C ₁₀ H ₁₅ N	1016.60	-	X	1.03	x	x	EM
28	eucaliptol	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1025.90	1026	33.22	6.92	22.58	12.83	EM, IK, EST
29	3-amino-2,6-dimetoxipiridina	154	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	1027.80	-	X	x	x	0.72	EM
30	monoterpeno no identificado	152	C ₁₀ H ₁₆ O	1028.50	-	5.58	x	x	x	EM
31	ácido 2,4-dimetilciclohex-1-en-5-carboxílico	154	C ₉ H ₁₄ O ₂	1029.70	-	2.93	x	x	x	EM
32	1-metil-3-(1-metiletil)-benceno (<i>m</i> -cimeno)	134	C ₁₀ H ₁₄	1029.80	1030	9.77	x	4.00	x	EM, IK
33	limoneno	136	C ₁₀ H ₁₆	1031.10	1024	7.61	9.85	13.66	13.16	EM, IK, EST
34	1-metil-2-(1-metiletil)-benceno (<i>o</i> -cimeno)	134	C ₁₀ H ₁₄	1031.80	1022	X	6.86	10.77	x	EM, IK, EST
35	desconocido	154		1034.80	-	X	1.70	x	x	EM
36	1-metil-4-(1-metiletil)-benceno (<i>p</i> -cimeno)	134	C ₁₀ H ₁₄	1037.70	1030	X	0.61	1.53	3.73	EM, IK
37	monoterpeno no identificado	134	C ₁₀ H ₁₄	1041.20	1130	X	x	1.19	x	EM, IK

^aIR_{exp}: índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. ^bIR_{lit}: índices de Kovats de la literatura (Adams, 2007; NIST). ^cIdentificación por comparación con EM: espectros de masas, IK: índices de Kovats de la literatura, EST: estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich (≥98% de pureza). (-) El índice de Kovats no está reportado en una columna capilar DB-5MS. (x) El compuesto no fue detectado en el tratamiento.

Cuadro 31. VOCs identificados en *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado durante tres (Nod3) y cinco días (Nod5), en interacción intraespecífica (Nod-Nod) y en interacción interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt) (Continuación)

ID	Compuestos	PM	FM	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Area Total (%)				Identificación ^c
						Nod3	Nod5	Nod-Pyt	Nod-Nod	
38	1,8-nonadiino	120	C ₉ H ₁₂	1041.60	-	X	x	x	0.82	EM
39	biciclo[3.2.1]oct-6-en-3-ona	122	C ₈ H ₁₀ O	1042.90	-	X	x	x	0.65	EM
40	3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno (β-ocimeno)	136	C ₁₀ H ₁₆	1049.50	1050	X	0.51	0.11	x	EM, IK
41	2,3,4,7-tetrahidro-1 <i>H</i> -indeno	120	C ₉ H ₁₂	1051.00	-	X	1.20	x	x	EM
42	monoterpeno no identificado	136	C ₁₀ H ₁₆	1059.00	-	X	x	1.69	x	EM
43	3,5-dimetilanisol	136	C ₉ H ₁₂ O	1059.50	-	X	x	1.69	x	EM
44	1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno (γ-terpineno)	136	C ₁₀ H ₁₆	1060.20	1060	0.85	3.52	3.08	7.70	EM, IK, EST
45	1-metil-4-(1-metiletiliden)-ciclohexeno (α-terpinoleno)	136	C ₁₀ H ₁₆	1089.40	1088	0.29	1.68	1.35	1.61	EM, IK
46	caryophyllene-(i1)	204	C ₁₅ H ₂₄	1362.30	-	0.30	0.05	x	0.08	EM
47	sesquiterpeno no identificado	204	C ₁₅ H ₂₄	1366.40	-	1.37	0.79	1.05	1.26	EM
48	β-cariofileno	204	C ₁₅ H ₂₄	1383.70	1390	1.76	1.18	1.91	1.93	EM, IK, EST
49	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-ciclohexano (β-elemeno)	204	C ₁₅ H ₂₄	1409.30	1389	0.30	0.75	0.10	0.57	EM, IK
50	isocariofileno	204	C ₁₅ H ₂₄	1440.60	1428	0.33	0.28	0.31	0.52	EM, IK
51	humuleno v1	204	C ₁₅ H ₂₄	1455.40	1433	X	0.82	0.30	0.74	EM, IK
52	α-humuleno	204	C ₁₅ H ₂₄	1479.50	1474	0.38	0.20	0.26	0.40	EM, IK
53	4-metilen-2,8,8-trimetil-2-vinil-biciclo[5.2.0]nonano	204	C ₁₅ H ₂₄	1492.00	-	0.15	0.28	0.10	0.33	EM

^aIR_{exp}: índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. ^bIR_{lit}: índices de Kovats de la literatura (Adams, 2007; NIST). ^cIdentificación por comparación con EM: espectros de masas, IK: índices de Kovats de la literatura, EST: estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich (≥98% de pureza). (-) El índice de Kovats no está reportado en una columna capilar DB-5MS. (x) El compuesto no fue detectado en el tratamiento.

Cuadro 31. VOCs identificados en *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado durante tres (Nod3) y cinco días (Nod5), en interacción intraespecífica (Nod-Nod) y en interacción interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt) (Continuación)

ID	Compuestos	PM	FM	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Area Total (%)				Identificación ^c
						Nod3	Nod5	Nod-Pyt	Nod-Nod	
54	2-metileno-5-(1-metilvinil)-8-metil-biciclo[5.3.0]decano	204	C ₁₅ H ₂₄	1501.20	-	1.42	1.59	1.78	3.02	EM
55	compuesto tipo cariofileno	204		1508.80	-	10.98	2.37	5.70	2.23	EM
56	desconocido	176		1512.30	-	X	4.44	x	x	EM
57	compuesto tipo cariofileno	204		1513.00	-	X	x	x	4.26	EM
58	compuesto tipo azuleno	204		1513.50	-	X	6.04	x	x	EM
59	1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metiletenil)-azuleno (γ -gurjuneno)	204	C ₁₅ H ₂₄	1515.30	1479	X	x	x	4.32	EM, IK
60	2-isopropenil-4a,8-dimetol-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno (α -selineno)	204	C ₁₅ H ₂₄	1516.70	1505	X	x	x	1.93	EM, IK
61	sesquiterpeno no identificado	204	C ₁₅ H ₂₄	1524.60	-	1.03	x	x	x	EM
62	compuesto tipo azuleno	205	C ₁₅ H ₂₅	1525.10	-	0.37	x	1.96	x	EM
63	compuesto tipo azuleno	204	C ₁₅ H ₂₄	1525.10	-	X	x	x	5.12	EM
64	1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1-metiletenil)-azuleno (δ -guaieno)	204	C ₁₅ H ₂₄	1525.40	1526	1.63	6.47	x	1.35	EM, IK
65	compuesto tipo azuleno	204	C ₁₅ H ₂₄	1526.50	-	X	x	x	1.70	EM
66	sesquiterpeno no identificado	204	C ₁₅ H ₂₄	1527.40	-	X	6.46	x	x	EM
67	alcano no identificado	150		1529.70	-	X	x	x	1.44	EM
68	2,4a,5,6,9a-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil(1H)benzociclohepteno	204	C ₁₅ H ₂₄	1539.20	1478	2.21	2.84	2.77	3.33	EM, IK
69	sesquiterpeno no identificado	204	C ₁₅ H ₂₄	1548.80	-	1.66	x	0.59	2.19	EM
70	β -selineno	204	C ₁₅ H ₂₄	1551.20	1509	1.66	1.85	0.85	3.28	EM, IK

^aIR_{exp}: índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. ^bIR_{lit}: índices de Kovats de la literatura (Adams, 2007; NIST). ^cIdentificación por comparación con EM: espectros de masas, IK: índices de Kovats de la literatura, EST: estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$ de pureza). (-) El índice de Kovats no está reportado en una columna capilar DB-5MS. (x) El compuesto no fue detectado en el tratamiento.

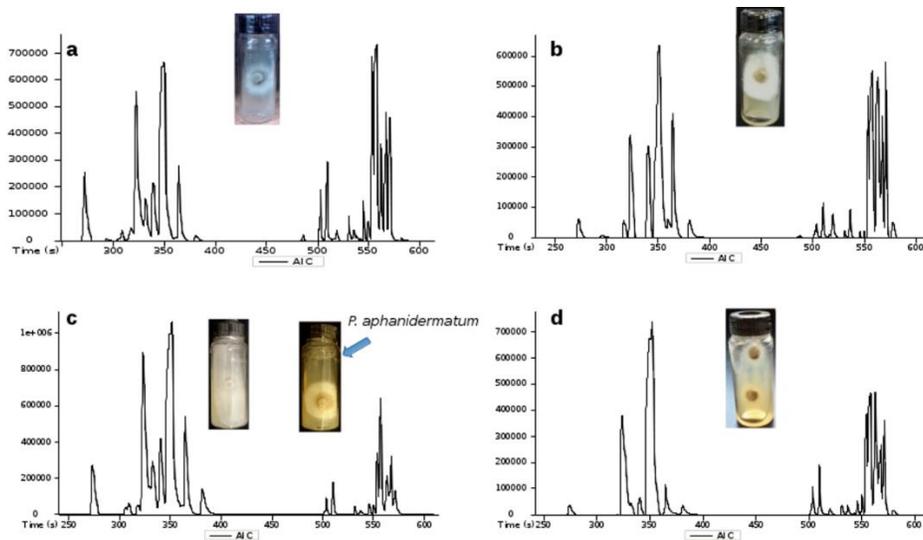


Figura 26. Cromatogramas representativos de los cuatro tratamientos. **a** *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado por tres días en PDA a 28 °C (Nod3). **b** *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado por cinco días en PDA a 28 °C (Nod5). **c** Interacción interespecífica entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado por dos días en PDA a 28 °C y *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt). **d** Interacción intraespecífica (Nod-Nod) cultivado por cinco días en PDA a 28 °C.

En la Figura 27, se presentan los resultados obtenidos organizados en un diagrama de Venn, revelando un patrón complejo en la producción de VOCs entre los diferentes tratamientos (días de crecimiento y tipo de interacción), ya que los metabolitos no fueron producidos exclusivamente en un tratamiento, sino en una mezcla en los diferentes tratamientos.

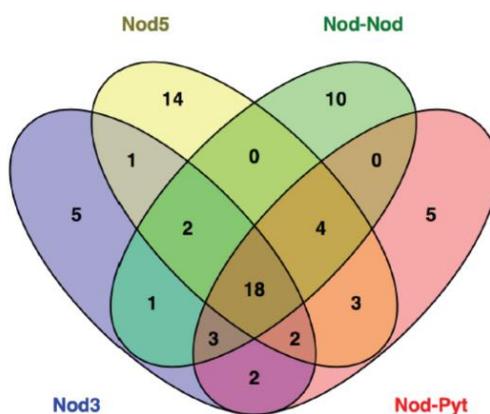
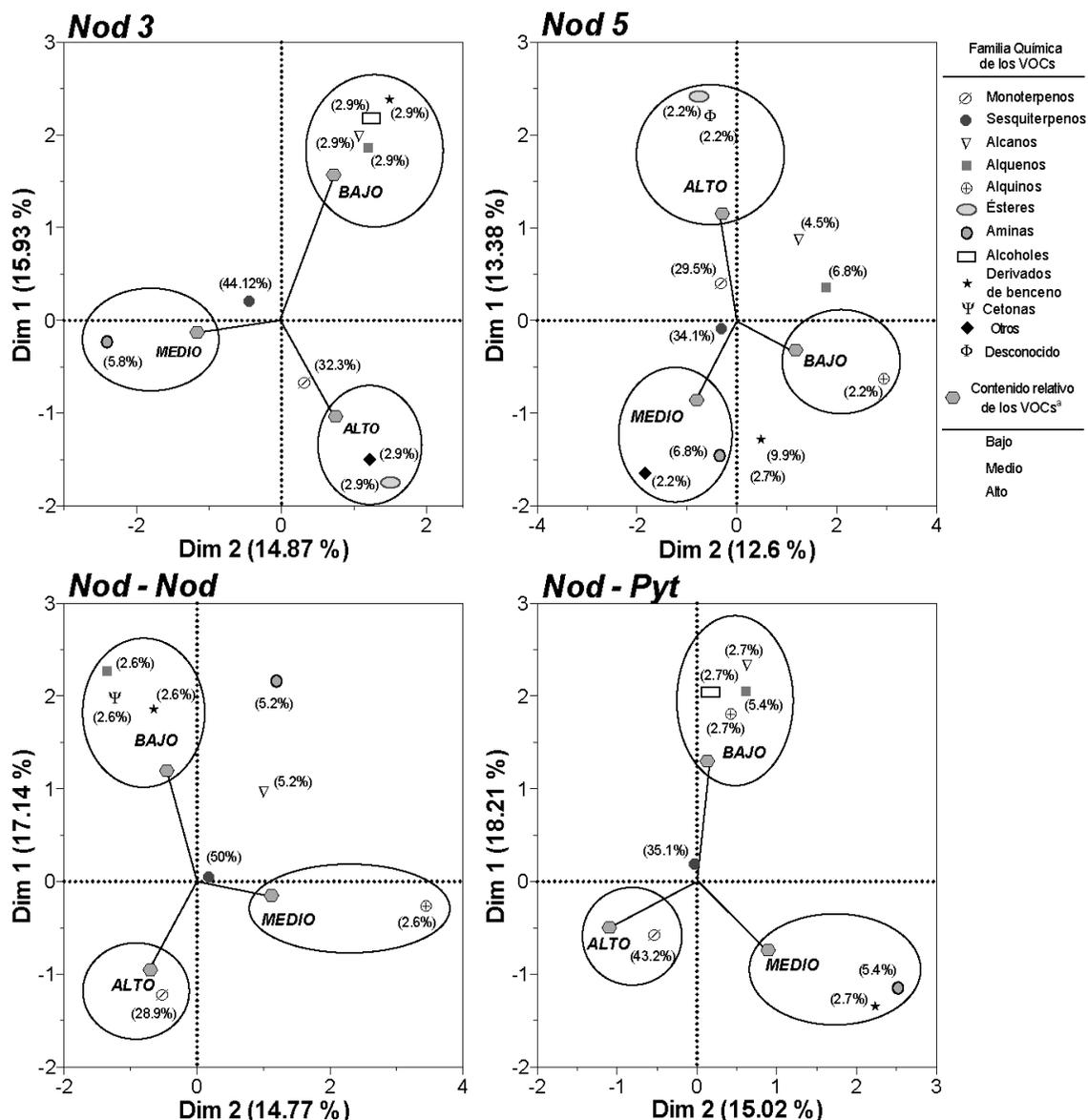


Figura 27. Diagrama de Venn que muestra los metabolitos volátiles compartidos entre los tratamientos. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a los tres días (Nod3), *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a a los cinco días (Nod5), la interacción intraespecífica (Nod-Nod) y la interacción interespecífica con *Pythium aphanidermatum* (Nod-Pyt).

13.1.1. Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA) de los perfiles de VOCs

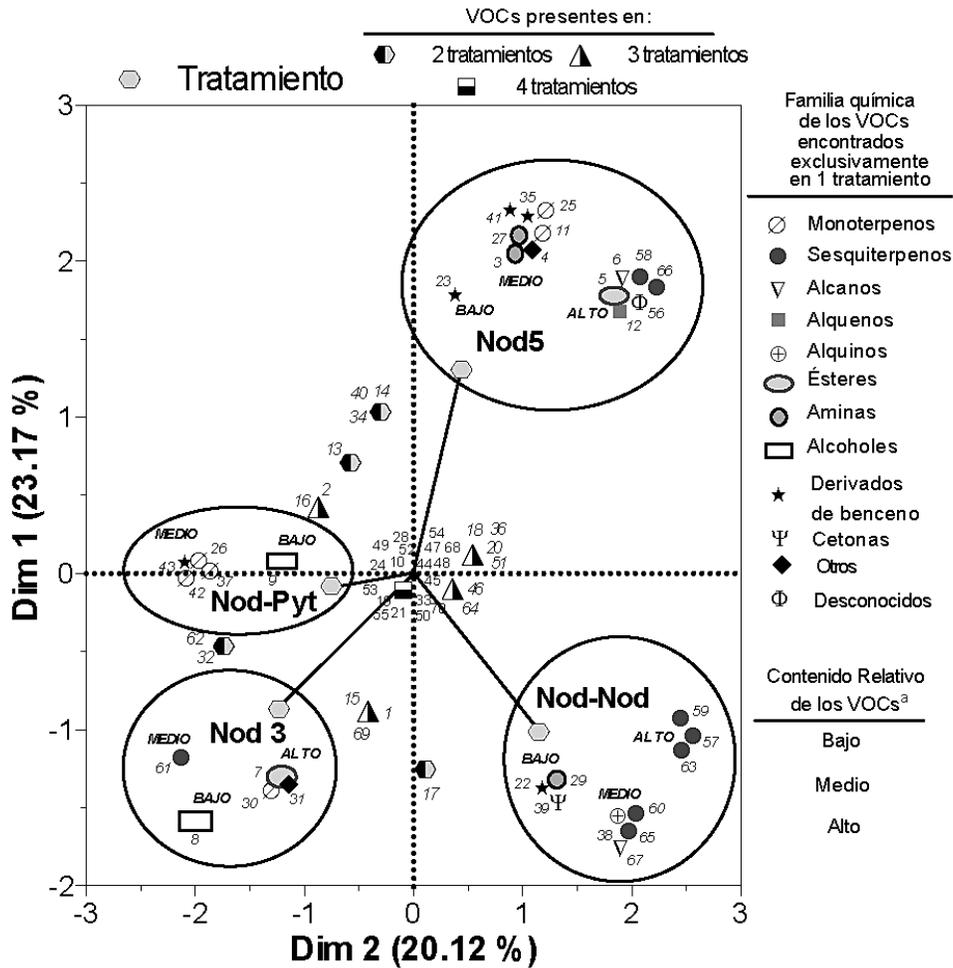
El análisis de correspondencia múltiple, llevado a cabo con los resultados obtenidos, permitió establecer la asociación entre la diversidad de los VOCs pertenecientes a las principales familias químicas y el contenido relativo de estos compuestos para cada condición experimental.

En la Gráfica 16 se presenta la distribución de los VOCs por familia química y por contenido relativo (% de área: bajo, medio o alto), basado en el perfil de volátiles de cada tratamiento. Se observa claramente las diferencias químicas cualitativas y cuantitativas entre los tratamientos, proporcionando una imagen clara de la producción de VOCs. Se observó que el perfil de la producción de compuestos orgánicos volátiles varió de acuerdo con el tratamiento. En particular, los monoterpenos fueron producidos en gran proporción por Nod-Nod y Nod-Pyt; por otro lado, la abundancia relativa de los sesquiterpenos fue similar en todos los otros tratamientos. Por lo tanto, la diferencia entre los tratamientos fue de acuerdo a la mayor o menor producción de los diversos grupos de familias químicas, aparte de mono y sesquiterpenos, que se encuentra en diferente abundancia relativa (% de área). Por ejemplo, la producción de alquinos por Nod5, ausentes en Nod3. Nod3 se caracteriza por la alta producción de ésteres y compuestos que pertenecen a varias familias (otros), y Nod5 por la alta producción de ésteres y compuestos desconocidos. La producción de aminas, monoterpenos y sesquiterpenos fue constante entre Nod3 y Nod5. La diferencia está dada por la abundancia relativa de alcanos, alquenos, alcoholes, derivados del benceno, alquinos (ausentes en Nod3), metabolitos desconocidos y otros compuestos. Por otro lado, la producción de monoterpenos y alquenos fue constante en las interacciones intra e interespecíficas. La diferencia entre estos dos tratamientos fue la producción en diferente proporción de alcanos, alquinos, aminas, alcoholes y derivados de benceno, además, de las cetonas ausentes en Nod-Pyt.



Gráfica 16. Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA) de la asociación entre la diversidad de los compuestos orgánicos volátiles que pertenecen a las principales familias químicas y el contenido relativo de estos compuestos para cada condición experimental. ^aContenido relativo basado en la distribución de los percentiles 33.3% y 66.7% de los compuestos para cada tratamiento: baja, <33.3%; medio, 33.3-66.7%; y alta, > 66.7% de acuerdo al área total. Nod3 (<0.38, 0.38 a 1.69 y > 1.69), Nod5 (<0.75, 0.75 a 2.27 y > 2.27), Nod-Pyt (<0.49, 0.49 a 1.87 y > 1.87), y Nod-Nod (<0.82, 0.82 a 2.68 y > 2.68). Se elaboraron elipses de manera arbitraria para ayudar a la interpretación de la asociación de cada contenido relativo y las familias químicas asociadas a estas categorías. Nótese la asociación entre el alto contenido relativo y los monoterpenos en interacciones antagónicas Nod-Nod y Nod-Pyt y la producción constante de sesquiterpenos en todos los tratamientos. Los porcentajes (%) junto al símbolo de la familia química representa la cantidad relativa de cada familia química.

Por otra parte, la Gráfica 17 muestra el análisis MCA basado en la composición total de los VOCs detallados en el Cuadro 31. Es evidente la separación clara o tendencias metabólicas entre los cuatro tratamientos, y la composición química diferente en cada tiempo y tipo de interacción. Cada elipse encierra los metabolitos que se producen exclusivamente por cada tratamiento a expensas de los metabolitos en el extremo opuesto de la gráfica. El perfil metabólico de Nod3 es más cercano del de Nod-Pyt; por lo tanto, indica que comparten tendencias metabólicas comunes, y son distantes de Nod5 y Nod-Nod lo que significa que hay diferencias en la producción de volátiles. Los metabolitos proyectados cerca del origen son producidos por todos los tratamientos (18 compuestos) y no caracterizan ningún perfil metabólico, es decir, se producen constitutivamente y su producción no depende de la edad hongo, el tamaño del inóculo o si está interactuando o no con *P. aphanidermatum*. Estos metabolitos pueden constituir los marcadores químicos de la especie. Los metabolitos fuera de las elipses son producidos en diferentes cantidades por dos o tres de los tratamientos que están cercanos en la gráfica, y no son representativos de ningún tratamiento.



Gráfica 17. Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA) del perfil de compuestos orgánicos volátiles obtenido durante cada condición experimental. Cada número corresponde a los compuestos presentados en el Cuadro 31. ^aContenido relativo basado en la distribución de los percentiles 33.3 y el 66.7% de los compuestos para cada tratamiento: bajo, <33.3%; medio, 33.3 a 66.7%; y alta, > 66.7% de acuerdo al área total. Se elaboraron elipses de manera arbitraria para ayudar a la interpretación de los diferentes perfiles de volátiles de cada tratamiento. Nótese la clara separación entre el tiempo del crecimiento y el tipo de interacción antagonista.

13.1.2. VOCs en los tratamientos Nod3 y Nod5

El MCA mostró que los compuestos volátiles cambian dependiendo de la edad del hongo, lo cual concuerda con la diferencia en la actividad biológica observada en los bioensayos de antagonismo múltiples llevados a cabo, donde *Nodulisporium* sp. de tres y cinco días de crecimiento inhiben a distancia a los microorganismos competidores, siendo mayor la inhibición a los cinco días de crecimiento del endófito.

En las muestras de Nod3, se detectaron 34 VOCs, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos (Gráficas 14 y 16). Los compuestos con la más alta afinidad a la fibra fueron el eucaliptol (33.22%), seguido de un compuesto tipo cariofileno (ID 55, 10.98%), y el *m*-cimeno (9.77%) (Gráfica 15). Asimismo, se detectaron 44 VOCs en los tratamientos de Nod5 (Cuadro 31), estos compuestos también corresponden principalmente a mono y sesquiterpenos (Gráficas 14 y 16). Los compuestos con mayor afinidad a la fibra empleada fueron el limoneno (9.85%), el eucaliptol (6.92%), y el *o*-cimeno (6.86%) (Gráfica 15). De los compuestos volátiles totales producidos, los dos tratamientos compartieron 23; cinco metabolitos fueron producidos exclusivamente por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultivado durante tres días y 14 compuestos, cuando se cultivó durante cinco días (Figura 27 y Gráfica 17).

13.1.3 VOCs en interacción antagónica intraespecífica Nod-Nod

La producción de volátiles también cambió en la interacción antagónica con otro inóculo de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (interacción intraespecífica). Bajo esta condición, se produjeron 38 VOCs, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, de los cuales, nueve compuestos fueron específicos de esta interacción (Figura 27 y Gráficas 14 y 17). Los compuestos con la más alta afinidad a la fibra fueron el limoneno (13.16%), el eucaliptol (12.83%), y el γ -terpineno (7.70%) (Gráfica 15). Por otro lado, del total de volátiles identificados, 24 fueron también encontradas en el día tres del crecimiento fúngico; y 24 compuestos en el cultivo de cinco días (Figura 27 y Gráfica 17).

Estos compuestos podrían servir como una señal de reconocimiento de otra colonia de *Nodulisporium* sp. Además, el número de inóculos podría afectar el resultado de la interacción al cambiar los volátiles producidos.

13.1.4. VOCs en interacción antagónica interespecífica Nod-Pyt

Considerando que *P. aphanidermatum* fue el microorganismo más afectado en las bioensayos de antagonismo múltiples, se analizó la producción de VOCs en interacción interespecífica entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y *P. aphanidermatum*.

El perfil de VOCs en la interacción interespecífica difiere de los demás tratamientos, además, la mezcla de VOCs exhibió propiedades antifúngicas, ya que inhibieron por completo el crecimiento de *P. aphanidermatum* en los viales de SPME. En esta interacción antagónica, se identificaron 37 compuestos, principalmente mono y sesquiterpenos (Gráficas 14 y 16). Los compuestos con la mayor afinidad a la fibra fueron el eucaliptol (22.58%), el limoneno (13.66%), y el *o*-cimeno (1.77%) (Gráfica 15). De estos compuestos, 5 se identificaron solo en la interacción interespecífica antagónica (Figura 27 y Gráfica 17), y pertenecían a *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, ya que *P. aphanidermatum* no produjo compuestos volátiles, resultado que concuerda con la literatura. Los compuestos producidos exclusivamente a partir de la interacción interespecífica fueron el 2-metil-1-butanol, el 4-careno, dos monoterpenos no identificados (ID 37 y 42) y el 3, 5-dimetilanol. Además, a partir de los compuestos totales producidos, 25 también fueron encontrados en los identificados en los cultivos de tres días, y 27 en los cultivos de cinco días (Figura 27 y Gráfica 17). Por otra parte, 24 de los 37 compuestos detectados se encontraron también en la interacción intraespecífica Nod-Nod.

Del total de compuestos detectados, sólo 18 estaban presentes en todos los tratamientos, en diferentes proporciones. Estos metabolitos fueron: tuyenol, 2-pentilfurano, α -felandreno, α -terpineno, eucaliptol, limoneno, γ -terpineno, α -terpinoleno, un sesquiterpeno no identificado (ID 47), β -cariofileno, β -elemeno, isocariofileno, α -humuleno, 4-metilen-2,8,8-trimetil-2-vinil-biciclo[5.2.0]nonano; 2-metilen-5-(1-metilvinil)-8-metil-biciclo[5.3.0]decano, un compuesto tipo cariofileno (ID 55), 2,4a, 5,6,9a-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil(1*H*)benzociclohepteno y β -selineno (Figura 27 y Gráfica 17).

Cabe señalar que únicamente durante la interacción antagónica interespecífica Nod-Pyt hubo producción de VOCs que no se sintetizaron en los otros tratamientos (biosíntesis *de novo*), mientras que otros fueron suprimidos debido a la presencia del oomiceto fitopatógeno *P. aphanidermatum*. La biosíntesis *de novo* de estos metabolitos se podría lograr a través de la activación de los genes que fueron suprimidos en los cultivos de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, y activados por el estrés biótico, es decir, la presencia de *P. aphanidermatum* (Bertrand et al. 2014). La inducción de la síntesis de terpenos ha sido

reportada a través de la activación de terpeno sintasas en las fermentaciones mixtas de *Fusarium* spp. con hongos o bacterias (Minerdi et al. 2009; Müller et al. 2012; Bertrand et al. 2014). En este trabajo, tres de los cinco compuestos, producidos exclusivamente en la interacción interespecífica, son monoterpenos, además, estos cinco compuestos podrían tener propiedades antifúngicas que inhiben a los competidores, como se demuestra en los estudios sobre el cocultivo de microorganismos para la inducción de metabolitos secundarios antimicrobianos (Bertrand et al. 2014). De igual forma, el cambio en el perfil de VOCs debería determinarse cuando *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a está interactuando con otros hongos fitopatógenos u oomicetos, como en los bioensayos de antagonismo múltiples llevados a cabo, ya que el perfil de VOCs podría cambiar dependiendo de los competidores; y por lo tanto, su actividad biológica. Además, los VOCs producidos en la interacción podrían actuar contra otros fitopatógenos. Por lo tanto, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a probablemente produce compuestos orgánicos volátiles como mecanismo de defensa frente a los competidores fúngicos dentro de la planta hospedera, pero también como respuestas defensivas de la hospedera contra fitopatógenos y competidores (Gao et al. 2010).

Los cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil de los VOCs, durante el tiempo del crecimiento fúngico y en interacción antagónica, se reportaron previamente en basidiomicetos descomponedores de la madera (Hynes et al. 2007; Evans et al. 2008). En el estudio realizado por Hynes y colaboradores (Hynes et al. 2007), se observó que, aunque no hubo inhibición a larga distancia entre los basidiomicetos *Hypholoma fasciculare* y *Resinicium bicolor*, se detectó la producción de VOCs en ambos hongos, que cambió durante el tiempo de la interacción. En el caso de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, se observó que los VOCs fueron un mecanismo de defensa a distancia en las interacciones antagónicas. Sin embargo, también podrían estar presentes en las interacciones antagónicas donde no se observó inhibición a distancia.

De acuerdo con estos resultados, deben llevarse a cabo más estudios con el fin de comprender mejor las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a realizando ensayos *in vivo* en la hospedera *G. sepium* para

probar si *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a puede proteger a la planta de ataques de patógenos mediante la inhibición directa, o por la producción de compuestos orgánicos volátiles. Adicionalmente, son necesarios más estudios en la protección de cultivos, ya que los metabolitos secundarios descritos en este trabajo pueden ser útiles para el control biológico contra hongos y oomicetos fitopatógenos (micofumigación); ya sea mediante el uso de un inóculo o más de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, o a través de la interacción interespecífica (Nod-Pyt), para la inhibición o el control del crecimiento de fitopatógenos en los tratamientos post-cosecha, o directamente en los cultivos.

13.1.5. Función Ecológica y la actividad biológica de los VOCs identificados

Los terpenos como el mirceno, eucaliptol, cariofileno, terpineno, entre otros, producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a son componentes de aceites esenciales de plantas medicinales y producidos frecuentemente por hongos (Mulyaningsih et al. 2010; Morath et al. 2012; Zhi-Lin et al. 2012). Estos compuestos juegan un papel importante en la comunicación entre plantas, planta-insectos y las interacciones planta-patógeno. Los mono y sesquiterpenos poseen en algunos casos actividad antifúngica, que podrían constituir un mecanismo antagónico durante las interacciones fúngicas (Evans et al. 2008; Minerdi et al. 2011). Además, los sesquiterpenos son útiles para la comunicación entre invertebrados y para localizar sus plantas o animales hospederos; también son útiles en las plantas y los hongos para atraer a los insectos para la dispersión de propágulos y para la defensa contra los patógenos. Asimismo, se utilizan para estimular el crecimiento de las plantas y como agentes antifúngicos (Hynes et al. 2007; Minerdi et al. 2011; Effmert et al. 2012; Zhi-Lin et al. 2012).

Algunos de los compuestos producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a fueron identificados previamente de otros aislamientos de *Nodulisporium* sp. Compuestos como eucaliptol, β -cariofileno, β -elemeno, γ -gurjuneno y 3-metil-1-butanol también son producidos por el endófito *Nodulisporium* sp., aislado de *Myroxylon balsamum*, y sus VOCs poseen actividad antifúngica contra microorganismos fitopatógenos (Mends et al. 2012). Los compuestos limoneno, eucaliptol, γ -terpineno, β -ocimeno, 3-metil-1-butanol, 4-careno,

δ -guaiene y 1,2,4-tris-(metileno)ciclohexano se identificaron en el endófito *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34, aislado de *Lagerstroemia loudoni*. Este hongo tiene potencial como agente de control biológico de enfermedades de cítricos en etapa de post-cosecha causadas por *P. expansum* y *P. digitatum* y contra otros hongos fitopatógenos (Suwannarach et al. 2013). Otras especies endófitas de *Nodulisporium*, aisladas de *Thelypteris angustifolia* (Riyaz-Ul-Hassan et al. 2013) y *Persea indica* (Tomscheck et al. 2010), producen 1,2,4-tris (metileno)-ciclohexano y eucaliptol; y el endófito aislado de *Cassia fistula* (Nigg et al. 2014), también produce eucaliptol. Sus volátiles inhiben hongos y oomicetos fitopatógenos. Por otro lado, los compuestos restantes detectados no se han reportado anteriormente para el género *Nodulisporium*. Además, las funciones biológicas de varios de los compuestos volátiles puros fueron previamente reportadas. Por ejemplo, el monoterpeno eucaliptol o 1,8-cineol es un constituyente de los aceites esenciales de muchas plantas medicinales y aromáticas, con actividad antibacteriana (Nikolić et al. 2011) y antifúngica contra *A. flavus*, *Aspergillus parasiticus* (Vilela et al. 2009), *A. niger* (Stojković et al. 2011), y *S. sclerotiorum*. También, se le ha atribuido potencial de biocombustible (Nigg et al. 2014). El β -cariofileno es producido por *F. oxysporum* MSA 35 (Minerdi et al. 2011) y *Talaromyces wortmannii* (Yamagiwa et al. 2011; Zhi-Lin et al. 2012). Este sesquiterpeno podría mejorar el crecimiento de plantas e inducir la tolerancia o resistencia a los patógenos fúngicos *Colletotrichum higginsianum* y *B. cinerea*. *Streptomyces globisporus* JK-1 produce β -cariofileno que inhibe el crecimiento micelial, la germinación de conidias y la esporulación de *Penicillium italicum* (Li et al. 2010). También, endófitos como *Muscodor yucatanensis* (Macías-Rubalcava et al. 2010), *Phoma* sp. (Strobel et al. 2011), y el hongo ectomicorrízico *Paxillus involutus* cepas MAJ y NAU (Müller et al. 2013) producen β -cariofileno. Adicionalmente, el monoterpeno limoneno es un compuesto antifúngico que inhibe el crecimiento micelial y la producción de aflatoxina B1 de *A. flavus* (Singh et al. 2010). El limoneno también suprime el crecimiento micelial, la germinación de conidias y la esporulación de *P. italicum* (Li et al. 2010). Por lo tanto, el eucaliptol, β -cariofileno y limoneno, al formar parte de los compuestos que se encontraron con una alta afinidad a la fibra y constituir compuestos con actividad antifúngica, podrían ser parte importante de los responsables de la actividad biológica mostrada por la mezcla

de VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Por último, también se detectaron 2-metil-1-butanol y 4-careno en endófitos productores de VOCs antifúngicos (Li et al. 2010; Macías-Rubalcava et al. 2010; Suwannarach et al. 2013). Estos compuestos fueron producidos exclusivamente en la interacción interespecífica.

13.2. Identificación de los componentes volátiles y semivolátiles del medio de cultivo y micelio y de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

El análisis por CG-EM del extracto activo del medio de cultivo permitió establecer que está compuesto por alcoholes, un aldehído, mono y sesquiterpenos, ésteres, ácidos carboxílicos y una benzofuranona (Cuadro 32). El compuesto mayoritario es un ácido carboxílico con un 19.73% del área total. Dentro de los monoterpenos se identificó al eucaliptol. La detección de eucaliptol, y otros monoterpenos, en el extracto del medio de cultivo confirmó que el hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a produce VOCs en abundante proporción.

Por otra parte, el extracto del micelio está compuesto por sesquiterpenos, ácidos carboxílicos y ésteres (Cuadro 32). El compuesto mayoritario es un ácido carboxílico con un 75.02% del área total.

Los compuestos detectados en el medio de cultivo pueden estar involucrados en la actividad biológica demostrada por este extracto sobre los hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia agrícola y sobre las plantas de prueba.

Cuadro 32. Componentes volátiles y semivolátiles del extracto de medio de cultivo y micelio de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

Compuesto	PM	FM	IR _{exp} ^a	IR _{lit} ^b	Área Total (%)	Identificación ^c
Medio de cultivo						
eucaliptol	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1026.1	1026	1.80	EM, IK, STD
hexahidro-3a,7a-dimetil-2(3H)-benzofuranona	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	1199.6	-	0.50	EM
2-hidroxiceinol	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1230.6	1230	1.91	EM, IK
1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1249.4	-	2.62	EM
4-n-propil-3-oxabicyclo[4.4.0]decano	182	C ₁₂ H ₂₂ O	1284.5	-	1.95	EM
1-Isobutil-2,5-dimetiletilhexano	168	C ₁₂ H ₂₄	1499.3	-	5.74	EM
sesquiterpeno desconocido	222		1709.5	-	0.60	EM
octadecanoato de 2-propenilo	324	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	2128.5	-	0.82	EM
9,12-octadecadienal	264	C ₁₈ H ₃₂ O	2248.5	-	9.59	EM
ácido carboxílico	282		2254	-	19.73	EM
ácido carboxílico	284		2270.9	-	2.40	EM
Micelio						
4-metilen-2,8,8-trimetil-2-vinilbicyclo[5.2.0]nonano	204	C ₁₅ H ₂₄	1525.1	-	1.36	EM
2-isopropenil-5-isopropil-7,7-dimetil-bicyclo[4.1.0]-3-hepteno	204	C ₁₅ H ₂₄	1567.5	-	0.24	EM
9,12-octadecadienoato de metilo	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	2157.8	2101	0.26	EM
ácido carboxílico	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂		-	75.02	EM
ácido carboxílico	284		2291.8		4.05	EM
ácido 8,11,14-eicosatrienoico	306	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	2494.4	-	1.03	EM
2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno	410	C ₃₀ H ₅₀	2820.7	2833	0.48	EM, IK

^aIR_{exp}: índices de Kovats calculados a partir de los datos de tiempo de retención en una columna capilar DB-5MS. ^bIR_{lit}: índices de Kovats de la literatura (Adams, 2007; NIST). ^cIdentificación por comparación con EM: espectros de masas, IK: índices de Kovats de la literatura, EST: estándares auténticos adquiridos de Sigma-Aldrich (≥98% de pureza). (-) El índice de Kovats no está reportado en una columna capilar DB-5MS. Los compuestos con similitud por debajo a 80% se eliminaron.

VII. Conclusiones

Las plantas recolectadas en la REBIOSH poseen un gran número de hongos endófitos debido a que las hospederas habitan en una zona de alta biodiversidad. Durante las etapas de aislamiento y purificación se observaron un gran número de interacciones entre los hongos endófitos, lo que condujo a elegir a los hongos endófitos de *G. sepium* para realizar los bioensayos de antagonismo *in vitro*, y continuar con el estudio de las interacciones entre endófito-endófito y endófito-fitopatógeno.

La determinación detallada de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos endófitos de *G. sepium* permitió la identificación de algunos de ellos como pertenecientes a los géneros *Xylaria*, *Nodulisporium*, y *Fusarium*.

El empleo de técnicas de biología molecular permitió confirmar la identificación de los hongos GSE27 y GSE8 como pertenecientes al género *Nodulisporium* sp. anamorfo de *Hypoxylon anthochroum* y al hongo GSE13 como *Nodulisporium* sp. anamorfo de *Daldinia eschscholtzii*. Aunque los hongos GSE27 y GSE8 se identificaron como la misma especie, las características macroscópicas y su actividad antagónica contra los hongos endófitos y fitopatógenos los diferencian, por lo que son variantes morfológicas de *H. anthochroum*. Asimismo, el hongo GSE11 fue identificado como *Fusarium equisetii* y los hongos GSE21 y GSE25, como *Xylaria* sp.

En los bioensayos de antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos se presentaron varios tipos de interacciones, las cuales fueron de cohabitación (0/0), antagonismo (-/0), coantagonismo (-/-) y agonismo (-/+). En las interacciones antagónicas intervinieron varios mecanismos simultáneos.

En las interacciones mediadas por cohabitación el crecimiento de las hifas de los micelios se entremezcló, y no hubo inhibición o estimulación del crecimiento, como en las interacciones establecidas con los hongos del género *Nodulisporium*.

Las interacciones antagónicas se llevan a cabo por medio de mecanismos químicos, es decir, la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, y en algunas ocasiones provocando efectos inhibitorios a distancia como el observado con los endófitos

GSE20 y GSE19.

El coantagonismo se presentó en varias interacciones, particularmente, con los hongos del grupo I, donde se observó la inhibición del crecimiento de ambos hongos competidores, y el cese de su crecimiento, debido a la producción de compuestos antifúngicos. En otros antagonismos como los establecidos por los hongos GSE19 y GSF1 prevalecen los mecanismos físicos como son las barreras miceliales y las prolongaciones del micelio.

El agonismo se observó en las interacciones con los hongos *Xylaria* sp. (GSE18), GSE24, GSE25 y con *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, donde el mecanismo fue la producción de compuestos antifúngicos y el reemplazo del micelio de los competidores.

La variedad de interacciones observadas indican que los hongos endófitos habitan en un microambiente complejo, donde compiten por mantener su lugar en la hospedera.

Los hongos endófitos de *G. sepium* inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos, tanto los aislados de la planta hospedera, como a los hongos y oomicetos de importancia agrícola. Principalmente, mediante interacciones agonistas (-/+), donde el endófito inhibió el crecimiento de los fitopatógenos, y creció sobre éstos (mecanismos físicos), además de, producir metabolitos secundarios bioactivos (mecanismos químicos).

El hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, eliminó a cuatro oomicetos fitopatógenos de interés agrícola e inhibió el crecimiento de los demás fitopatógenos de prueba, por lo que los hongos más competitivos podrían proteger a la hospedera de posibles ataques de hongos y oomicetos fitopatógenos de manera directa; y al mismo tiempo constituir agentes específicos de control biológico

El estudio de las interacciones antagónicas *in vitro* permite seleccionar hongos endófitos que producen metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano, entre otros.

La producción de metabolitos secundarios por parte de los hongos endófitos de *G. sepium* se corroboró, debido a que sus extractos orgánicos inhibieron el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola y, en consecuencia, también se comprobó que las interacciones antagónicas están regidas por mecanismos químicos.

La producción de metabolitos secundarios bioactivos se ve influenciada por las condiciones

de cultivo, las cuales favorecen más a unos hongos que a otros. En general, la mejor condición de fermentación fue el cultivo en medio CPD incubando a los hongos bajo condiciones estáticas.

Los extractos fúngicos de los hongos endófitos *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (GSE27) y *Xylaria* sp. GSE18 son los más activos, además de ser los hongos más antagonistas en bioensayos *in vitro*.

Los hongos endófitos de *G. sepium*, además producen metabolitos secundarios fitotóxicos, los cuales también cambian dependiendo de la condición de cultivo. La mayor actividad fitotóxica se presentó en los extractos derivados de los cultivos en medio CPD incubados bajo condiciones estáticas, y en extractos de los cultivos en medios sólidos en MA y PDA.

Los extractos orgánicos de los hongos endófitos *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (GSE27) y *Xylaria* sp. GSE18 poseen el mayor efecto fitotóxico.

Los metabolitos fitotóxicos se producen para la colonización de la planta hospedera, y pueden ser necesarios para su sobrevivencia dentro de la planta, por lo que podrían ser utilizados como herbicidas de malezas de importancia en la agricultura.

Las interacciones antagonistas *in vitro* aunadas a la determinación de la actividad biológica a nivel de extractos fúngicos de los hongos endófitos de *G. sepium* permitió seleccionar al hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a como candidato idóneo para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos.

El estudio químico biodirigido del extracto activo del medio de cultivo del hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a permitió obtener cuatro isobenzofuranonas antifúngicas: la 7-hidroxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**28**), la 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**), la 6-formil-4-metil-7-metoxi-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**30**) y la 7-metoxi-6-metil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**31**), de las cuales, la 7-metoxi-6-metil-3*H*-isobenzofuran-1-ona constituye un nuevo producto natural.

La 7-metoxi-4,6-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**29**) posee la mayor actividad biológica. Esta isobenzofuranona podría considerarse como un candidato para su uso en la agricultura en el control de hongos y oomicetos fitopatógenos.

El hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a produce compuestos orgánicos volátiles bioactivos a los tres y cinco días de crecimiento. Estos compuestos cambian cualitativa y cuantitativamente y, además, cambian en la interacción interespecífica *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a - *P. aphanidermatum*, y en interacción intraespecífica *Nodulisporium* sp. – *Nodulisporium* sp.

Los principales compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a fueron los monoterpenos, como el eucaliptol y el limoneno, y sesquiterpenos como el cariofileno. Además, este endófito produce una gran variedad de compuestos volátiles, entre ellos, ésteres, alcoholes, derivados del benceno, aminas, hidrocarburos y cetonas.

Los principales compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a podrían ser utilizados como agentes de control biológico de hongos y oomicetos fitopatógenos de interés en la agricultura.

En los extractos orgánicos del micelio y medio de cultivo del endófito *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a se identificó, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas la presencia de alcoholes, aldehídos, mono y sesquiterpenos, ésteres, y ácidos carboxílicos, que pueden contribuir a la actividad antifúngica y fitotóxica demostrada por los extractos fúngicos y fracciones primarias.

En resumen, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a inhibió el crecimiento, o eliminó a los fitopatógenos de importancia agrícola, mediante la emisión de VOCs, la producción de metabolitos difusibles en el medio, como las isobenzofuranonas antifúngicas; y por interacciones hifales que actúan en conjunto. Por lo que el hongo *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a tiene potencial como agente de biocontrol (micofumigación).

VIII. Perspectivas

- Identificar hasta especie a los hongos endófitos y fitopatógenos aislados de *Gliricidia sepium*.
- Realizar estudios *in vivo* con plantas de *G. sepium* libres de endófitos y corroborar si los hongos endófitos en estudio podrían contribuir directamente en la defensa de su planta hospedera protegiéndola del ataque de microorganismos fitopatógenos.
- Realizar el estudio químico biodirigido de los hongos endófitos más antagónicos con el fin de identificar los metabolitos secundarios bioactivos.
- Realizar el estudio químico de las fracciones primarias más activas de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, con la finalidad de aislar e identificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada.
- Identificar el principal compuesto producido en la zona de interacción antagónica entre *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y *Pythium aphanidermatum*, y evaluar su actividad biológica. Asimismo, realizar los perfiles cromatográficos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para determinar los cambios metabólicos en la interacción interespecífica.
- Determinar si *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a es un micoparásito por medio del estudio de las interacciones hifales con los fitopatógenos.
- Sintetizar químicamente las isobenzofuranonas **28–31** para poder realizar bioensayos adicionales y obtener derivados químicos.
- Establecer las CI_{50} de las isobenzofuranonas aisladas de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a sobre los microorganismos fitopatógenos de prueba y su efecto fitotóxico.
- Establecer el mecanismo de acción antifúngico de las isobenzofuranonas (**28–31**) aisladas, profundizando en el estudio sobre la permeabilidad de la pared y/o membrana celular. Asimismo, evaluar su efecto sobre la germinación y viabilidad de las zoosporas y/o conidias.
- Evaluar el efecto fitotóxico de los extractos de *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a y

compuestos puros con otras malezas de importancia agrícola, y establecer el mecanismo de acción fitotóxico de los principales compuestos puros.

- Determinar la toxicidad de los extractos orgánicos, metabolitos secundarios y derivados sintéticos sobre la mortalidad del crustáceo *Artemia salina* y sobre la viabilidad de macrófagos murinos. Asimismo, establecer la toxicidad aguda en ratones.
- Confirmar la identidad de los VOCs producidos por *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a en diferentes días de cultivo y en interacción antagónica inter e intraespecífica, mediante el empleo de un mayor número de estándares.
- Establecer la producción de los VOCs en interacción antagónica intraespecífica, mediante el empleo de un mayor número competidores fitopatógenos y en bioensayos de antagonismo múltiple.
- Estudiar el potencial de uso de los VOCs en la protección de cultivos postcosecha.

IX. Referencias bibliográficas

- Adams, R.P., 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy* 4th ed., Caron Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant pathology* fifth edit., San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.
- Akins, R.A. & Lambowitz, A.M., 1985. General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. *Mol. Cell. Biol.*, 5, p.2272–2278.
- Aliferis, K.A. & Jabaji, S., 2011. Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(2), p.105–117.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), p.403–10.
- Arnold, A.E. & Lutzoni, F., 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), p.541–549.
- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100, p.15649–15654.
- Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.-S., Strem, M.D., Park, S.-C., Ryu, C.-M., Melnick, R.L. & Bailey, B.A., 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Mol. plant-microbe Interact.*, 24(3), p.336–351.
- Baker, P.W., J., K., Dobson, A.D.W. & Marchesi, J.R., 2009. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona simulans* isolated from Irish coastal waters. *Mar Biotechnol.*, 11, p.540–547.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K. & Wolfender, J.L., 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol. Adv.*, 32, p.1180–1204.
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Monod, M., Gindro, K. & Wolfender, J.-L., 2013. *De novo* production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *J. Nat. Prod.*, 76(6), p.1157–1165.
- Boddy, L., 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 31(3), p.185–194.
- Dai, J., Krohn, K., Draeger, S. & Schulz, B., 2009. New naphthalene-chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea*. *Eur. J. Org. Chem.*, p.1564–1569.
- Dai, J., Krohn, K., Flörke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikszai, A., Antus, S., Kurtán, T. & van Ree, T., 2006. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *Eur.*

- J. Org. Chem., p.3498–3506.
- Deng, L., Zhang, L., Cao, L., Xie, R., Zhang, Y., He, W. & Jiang, H., 2014. Synthesis and insecticidal activity of novel camptothecin derivatives containing analogs of chrysanthemic acid moieties. *J. Integr. Agric.*, 13(6), p.1320–1330.
- Dewick, P.M., 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, UK: John Wiley & Sons.
- Don, M.-J., Shen, C.-C., Syu, W.-J., Ding, Y.-H. & Sun, C.-M., 2006. Cytotoxic and aromatic constituents from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 67, p.497–503.
- Duan, Y., Ge, C., Liu, S., Chen, C. & Zhou, M., 2013. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 106(1-2), p.61–67.
- Dugan, F.M., 2006. *The identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature*, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Eaton, C.J., Cox, M.P. & Scott, B., 2011. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Sci.*, 180(2), p.190–5.
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R. & Piechulla, B., 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol.*, 38, p.665–703.
- Ellis, M.B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes.*, Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute.
- Espinosa Gómez, A., 2012. *Búsqueda de hongos asociados a Magnolia dealbata Zucc productores de metabolitos con actividad antimicrobiana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Evans, J., Eyre, C., Rogers, H.J., Boddy, L. & Müller, C.T., 2008. Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecol.*, 1, p.57–68.
- Flores Reséndiz, M., 2014. *Hongos endófitos de Gliricidia sepium con potencial atagónico*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gamboa-Gaitán, M. A., 2006. Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colomb.*, 11(1), p.3–20.
- Gams, W., Diederich, P. & Pöldmaa, K., 2004. Fungicolous Fungi. In G. M. Mueller, G. F. Bills, & M. S. Foster, eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA: Elsevier, pp. 343–392.
- Gao, F., Dai, C. & Liu, X., 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African J. Microbiol. Res.*, 4(13), p.1346–1351.
- García, D.E., Wencomo, H.B. & Medina, M.G., 2008. Evaluación de la calidad nutritiva de siete ecotipos de *Leucaena macrophylla* (Benth .) en un suelo ferralítico rojo lixiviado. , 25, p.43–

67.

- Gardes, M. & Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.*, 2(2), p.113–118.
- Ge, M., Yin, Y., Chen, Y., Luo, M. & Chen, D., 2012. A novel phytotoxic nonenolide from *Phomopsis* sp. HCCB03520. *Chem. Biodivers.*, 9, p.403–408.
- Gerwick, B.C., Graupner, P.R., Fields, S.C., Schmitzer, P.R. & Brewster, W.K., 2008. Methylidene mevalonates and their use as herbicides. United States Patent US 7,393,812 B2. p.1-12.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Marrone, P., Morin, L. & Stewart, A., 2012. Have biopesticides come of age? *Trends in biotechnology*, 30(5), p.250-258.
- Grove, J.F., 1952. Gladiolic acid, a metabolic product of *Penicillium gladioli*. I. Structure. *Biochem. J.*, 50(5), p.648–66.
- Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Peña, K., Espinosa-Gómez, A., Sánchez-Fernández, Rosa E. Macías-Rubalcava, M.L., Flores-Cotera, L.B. & Sánchez, S., 2015. Endophytes as a potential source of new antibiotics. In S. Sanchez & A. L. Demain, eds. *Antibiotics Current Innovations and Future Trends*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 175–206.
- Hall, T., 2005. BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP.
- Harman, G.E., 2011. *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39(2), p.103–108.
- Hensens, O.D., Ondeyka, J.G., Dombrowski, A.W., Ostlind, D.A. & Zink, D.L., 1999. Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from a *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Lett.*, 40(1999), p.5455–5458.
- Herre, E.A., Mejia, C.L., Kyllö, D.A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A. & Van Bael, S.A., 2007. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88, p.550–558.
- Hynes, J., Müller, C.T., Jones, T.H. & Boddy, L., 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J. Chem. Ecol.*, 33, p.43–57.
- Jeffries, P., 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. *Can. J. Bot.*, 73(Suppl. 1), p.S1284–S1290.
- Ju, Y.-M. & Rogers, J.D., 1996. *A revision of the genus Hypoxylon*, St. Paul MI: APS Press.
- Kaniampady, M.M. & Arif, M.M., 2007. Essential oil composition of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and flowers. *Indian J. Chem.*, 46(August), p.1359–1360.
- Khan, T., Zahid, M., Asim, M., Shahzad-ul-Hussan, Iqbal, Z., Iqbal Choudhary, M. & Uddin Ahmad, V., 2002. Pharmacological activities of crude acetone extract and purified constituents of *Salvia moorcraftiana* Wall. *Phytomed*, 9, p.749–752.

- Kolak, U., Kabouche, A., Öztürk, M., Kabouche, Z., Topçuyh, G. & Ulubelen, A., 2009. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochem. Anal.*, 20, p.320–327.
- Kornerup, a. & Wanscher, J.H., 1967. *Methuen Handbook of Colour* 3d ed., London: Methuen E.
- Kuhnert, E., Fournier, J., Peršoh, D., Luangsa-ard, J.J.D. & Stadler, M., 2014. New *Hypoxylon* species from Martinique and new evidence on the molecular phylogeny of *Hypoxylon* based on ITS rDNA and β -tubulin data. *Fungal Divers.*, 64(1), p.181–203.
- Kumar, S. & Kaushik, N., 2012. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochem. Rev.*, 11(4), p.507–522.
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M., 2012. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chem. Biol.*, 19(7), p.792–798.
- Kusari, S., Pandey, S.P. & Spiteller, M., 2013. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry*, 91, p.81–7.
- Kusari, S., Zühlke, S. & Spiteller, M., 2011. Correlations between camptothecin and related metabolites in *Camptotheca acuminata* reveal similar biosynthetic principles and in planta synergistic effects. *Fitoterapia*, 82(3), p.497–507.
- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M.C. & Rubio, V., 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *J. Biotechnol.*, 75(2-3), p.187–194.
- Lee, S.O., Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Jang, K.S., Choi, Y.H. & Kim, J.C., 2009. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. *J. Appl. Microbio*, 106, p.1213–1219.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing. USA.
- Li, D., Wu, Z., Chen, Y., Tao, M. & Zhang, W., 2011. Chemical constituents of endophytic fungus *Nodulisporium* sp. A4 from *Aquilaria sinensis*. *China J. Chinese Mater. Medica*, 36(23), p.3276–3280.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G. & Hsiang, T., 2010. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biol. Technol.*, 58, p.157–165.
- Lin, X., Huang, Y., Fang, M., Wang, J., Zheng, Z. & Su, W., 2005. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 251(1), p.53–8.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. & Monte, E., 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 48, p.395–417.

- Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Bautista, B.E., Jiménez-Estrada, M., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T., Hernández-Ortega, S., Saucedo-García, A., Muria-González, J.M. & Anaya, A.L., 2008. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69, p.1185–1196.
- Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T. & Anaya, A.L., 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.*, 36, p.1122–1131.
- Macías-Rubalcava, M.L., Ruiz-Velasco Sobrino, M.E., Meléndez-González, C. & Hernández-Ortega, S., 2014. Naphthoquinone spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potential herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 62(16), p.3553–62.
- Macías-Rubalcava, M.L., Ruiz-Velasco Sobrino, M.E., Meléndez-González, C., King-Díaz, B. & Lotina-Hennsen, B., 2014. Selected phytotoxins and organic extracts from endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as light reaction of photosynthesis inhibitors. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 138, p.17–26.
- Matheron, M.E. & Porchas, M., 2006. Factors Affecting the development of wood rot on jemon trees infected with *Antrodia sinuosa*, *Coniophora eremophila*, and a *Nodulisporium* sp. *Plant Dis.*, 90, p.554–558.
- Meléndez-González, C., Murià-González, M.J., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B.E., Hernández-Ortega, S., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T. & Macías-Rubalcava, M.L., 2015. Acremoxanthone E, a novel member of heterodimeric polyketides with a bicyclo[3.2.2]nonene ring, produced by *Acremonium camptosporum* W. GAMS (Clavicipitaceae) endophytic fungus. *Chem. Biodivers.*, 12, p.133–147.
- Mends, M.T., Yu, E., Strobel, G.A., Riyaz-Ul-Hassan, S., Booth, E., Geary, B., Sears, J., Taatjes, C.A. & Hadi, M.Z., 2012. An endophytic *Nodulisporium* sp. producing volatile organic compounds having bioactivity and fuel potential. *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, 03(03), p.117.
- Minerdi, D., Bossi, S., Gullino, M.L. & Garibaldi, A., 2009. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. *Environ. Microbiol.*, 11, p.844–854.
- Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M.E., Gullino, M.L. & Garibaldi, A., 2011. *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 76, p.342–351.
- Monaghan, R.L., Polishook, J.D., Pecore, V.J., Bills, G.F., Nallin-Omstead, M. & Streicher, S.L., 1995. Discovery of novel secondary metabolites from fungi—is it really a random walk through a random forest? *Can. J. Bot.*, 73(S1), p.925–931.
- Montes-Molina, J. a., Luna-Guido, M.L., Espinoza-Paz, N., Govaerts, B., Gutierrez-Miceli, F. a. &

- Dendooven, L., 2008. Are extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (L.)) and *Gliricidia sepium* (Jacquin) an alternative to control pests on maize (*Zea mays* L.)? *Crop Prot.*, 27(3-5), p.763–774.
- Morath, S.U., Hung, R. & Bennett, J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.*, 26(2-3), p.73–83.
- Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., Zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J.-P. & Rosenkranz, M., 2013. Volatile profiles of fungi-chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genet. Biol.*, 54, p.25–33.
- Müller, M.E.H., Steier, I., Köppen, R., Siegel, D., Proske, M., Korn, U. & Koch, M., 2012. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. *J. Appl. Microbiol.*, 113, p.874–887.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J. & Wink, M., 2010. Phytomedicine synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Eur. J. Integr. Med.*, 17, p.1061–1066.
- Nakajima, H., Ishihara, A., Sawa, Y. & Sakuno, E., 2010. 3-(4-Methylfuran-3-yl)propan-1-ol: a white-spotted Stinkbug (*Eysarcoris ventralis*) repellent produced by an endophyte isolated from green foxtail. *J. Agric. Food Chem.*, 58, p.2882–2885.
- Nigg, J., Strobel, G., Knighton, W.B., Hilmer, J., Geary, B., Riyaz-ul-hassan, S., Harper, J.K., Valenti, D. & Wang, Y., 2014. Functionalized para-substituted benzenes as 1,8-cineole production modulators in an endophytic *Nodulisporium* species. *Microbiology*, 160, p.1772–1782.
- Nikolić, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B. & Knežević-Vukčević, J., 2011. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.*, 49(9), p.2035–45.
- Nozawa, K., Udagawa, S., Nakahima, S. & Kawai, K., 1989. A dioxopiperazine derivative from *Penicillium megasporum*. *Phytochemistry*, 28(3), p.929–931.
- Oliveros, J.C., 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Ercetin, T., Kahraman, A., Celep, F., Akaydin, G., Sener, B. & Dogan, M., 2013. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Ind. Crops Prod.*, 41(1), p.21–30.
- Park, M.-S., Ahn, J.-Y., Choi, G.-J., Choi, Y.-H., Jang, K.-S. & Kim, J.-C., 2010. Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple. *Plant Pathol. J.*, 26(3), p.253–259.
- Pinheiro De Carvalho Ribeiro, F., Sousa Fonseca, F.C., Alves Reis, I., Santos Araújo, I., Mitoshi Kamida, H., Branco, A. & Trovatti Uetanabaro, A.P., 2012. Xylariaceae endophytic fungi metabolites

- against *Salmonella*. In Y. Kumar, ed. *Isabella Alves Reis, Isabella Salmonella - A Diversified Superbug*.
- Pontius, A., Mohamed, I., Krick, A., Kehraus, S. & König, G.M., 2008. Aromatic polyketides from marine algicolous fungi. *J. Nat. Prod.*, 71(2), p.272–4.
- Queiroga, C.L., Teixeira Duarte, M.C., Baesa Ribeiro, B. & De Magalhães, P.M., 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*, 78, p.327–328.
- Reddy, L.J. & Jose, B., 2010. Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from the bark of *Gliricidia sepium*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2(3), p.177–179.
- Rehman, S., Mir, T., Kour, A., Qazi, P.H., Sultan, P. & Shawl, A.S., 2011. In vitro antimicrobial studies of *Nodulisporium* specie : An endophytic fungus. , 2(April), p.53–58.
- Rivero-Cruz, J.F., 2008. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J. Ethnopharmacol.*, 119(1), p.99–103.
- Riyaz-Ul-Hassan, S., Strobel, G., Geary, B. & Sears, J., 2013. An endophytic *Nodulisporium* sp. from Central America producing volatile organic compounds with both biological and fuel potential. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23(1), p.29–35.
- Rodrigues, K.F., 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86(3), p.376.
- Rodriguez, R.J., White, J.F., Arnold, a E. & Redman, R.S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.*, 182(2), p.314–330.
- Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Cota, B.B., Johann, S., Alves, T.M.A., Zani, C.L. & Rosa, C.A., 2011. Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. *Drug Dev. - a case study basid insight into Mod. Strateg.*, p.469–486.
- Rotheray, T.D., Chancellor, M., Jones, T.H. & Boddy, L., 2011. Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes. *Fungal Ecol.*, 4(1), p.42–55.
- Ruiz-Terán, F., Medrano-Martínez, A. & Navarro-Ocaña, A., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African J. Biotech.*, 7(12), p.1886–1893.
- Saldaña Fernández, C.-M., Munévar M., D.I., Ortiz Sánchez, A., Moreno, E.E. & Aragón Cadenas, A.N., 2007. Una visita a la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (Morelos, México). *Rev. Estud. Soc.* , Univ. Guadalajara, México, p.189–219.
- Sánchez Fernández, R.E., 2010. *Potencial alelopático de extractos del micelio y medio de cultivo de*

- un hongo endófito aislado de Lonchocarpus castilloi (Fabaceae)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y.K.M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C. & Macías-Rubalcava, M.L., 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), p.132–146.
- Sandoval-Espinosa, Y.K.M., 2014. *Aislamiento y purificación de hongos endófitos con potencial antifúngico y fitotóxico de Lysiloma acapulcense*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schulz, B. & Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, 109(6), p.661–686.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K. & Krohn, K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.*, 106(9), p.996–1004.
- Sears, J., Dirkse, E., Markworth, C. & Strobel, G.A., 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 147(11), p.2943–2950.
- Selim, K., El-beih, A., Abdel-rahman, T. & El-diwany, A., 2012. Biology of Endophytic Fungi. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, 2(1), p.31–82.
- Semmar, N., 2013. Two computational simplex approaches to graphical highlighting metabolic phenotypes and their functional origins: Correspondence Analysis and Weighted Metabolic Profiles Analysis. In *Metabolomics coming of age with its technological diversity*. Advances in Botanical Research. Elsevier, pp. 441–492.
- Shearer, C.A., 1995. Fungal competition. *Can. J. Bot.*, 73(S1), p.1259–1264.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Kumar, P. & Kishore, N., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem. Toxicol.*, 48(6), p.1734–1740.
- Spraker, J.E., Jewell, K., Roze, L. V, Scherf, J., Ndagano, D., Beaudry, R., Linz, J.E., Allen, C. & Keller, N.P., 2014. A volatile relationship: profiling an inter-kingdom dialogue between two plant pathogens, *Ralstonia solanacearum* and *Aspergillus flavus*. *J. Chem. Ecol.*, 40, p.502–513.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W.M., Sears, J. & Strobel, G., 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Sci.*, 165(4), p.913–922.
- Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Džamić, A., Čirić, A., Ristić, M. & Grubišić, D., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chem.*, 128(4), p.1017–1022.
- Strobel, G., 2011. *Muscodora* species- endophytes with biological promise. *Phytochem. Rev.*, 10(2),

p.165–172.

- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 5., 67, p.257–268.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W. & Ming Wah Chau, R., 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, 60(2), p.179–183.
- Strobel, G., Singh, S.K., Riyaz-Ul-Hassan, S., Mitchell, A.M., Geary, B. & Sears, J., 2011. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiol. Lett.*, 320(2), p.87–94.
- Suwannarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., Nuangmek, W., Matsui, K. & Lumyong, S., 2013. Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Prot.*, 45, p.63–70.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30, p.2725–2729.
- Tan, R.X. & Zou, W.X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, p.448–459.
- Teixeira, R.R., Pereira, J.L., Da Silva, S.F., Guilardi, S., Paixão, D.A., Anconi, C.P.A., De Almeida, W.B., Ellena, J. & Forlani, G., 2014. Synthesis, characterization and phytotoxic activity of hydroxylated isobenzofuran-1(3*H*)-ones. *J. Mol. Struct.*, 1061, p.61–68.
- Tian, P., Nan, Z., Li, C. & Spangenberg, G., 2008. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122(4), p.593–602.
- Tomscheck, A.R., Strobel, G., Booth, E., Geary, B., Spakowicz, D., Knighton, B., Floerchinger, C., Sears, J., Liarzi, O. & Ezra, D., 2010. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microb. Ecol.*, 60(4), p.903–14.
- Tripathi, S., Kamal, S., Sheramati, I. & Oelmuller, R., 2008. Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. *Mycorrhiza*, p.281–306.
- Tuininga, A.R., 2005. Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. In J. Dighton et al., eds. *The Fungal Community: It's organization and role in the ecosystem*. pp. 265–283.
- Ulloa, M. & Hanlin, R., 1978. *Atlas de Micología Básica*, México: Concepto S.A. ed.
- Van Bael, S.A., Maynard, Z., Rojas, E., Mejía, L., Kylo, D.A., Herre, E.A., Robbins, N., Bischoff, J.F. & Arnold, A.E., 2005. Emerging perspectives on the ecological roles of endophytic fungi in tropical plants. In J. Dighton, J. F. White, & P. Oudemans, eds. *The Fungal Community: its organization*

and role in the ecosystem. Boca Ratón: Taylor and Francis.

- Verger, P.J.P. & Boobis, A.R., 2013. Reevaluate pesticides for food security and safety. *Science*, 341, p.717–718.
- Vilela, G.R., de Almeida, G.S., D'Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., da Silva, M.F.D.G.F., Silva, S.C., de Stefano Piedade, S.M., Calori-Domingues, M.A. & da Gloria, E.M., 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *J. Stored Prod. Res.*, 45(2), p.108–111.
- Wang, J.-F., Lin, X., Huang, Y.-J., Su, W.-J., Zhao, Y.-F. & Ng, S.W., 2003. 7-Methoxy-4,6-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online*, E59(8), p.o1235–o1236.
- Wang, R.-Y., Fang, M.-J., Huang, Y.-J., Zheng, Z.-H. & Shen, Y.-M., 2006. 7-Hydroxy-4,6-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online*, E62(9), p.o4172–o4173.
- Weber, D., 2009. Endophytic fungi, occurrence and metabolites. In T. Anke & D. Weber, eds. *The Mycota XV. Physiology and Genetics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 153–195.
- Webster, J. & Weber, R., 2007. *Introduction to Fungi*. Third edit., New York, USA: Cambridge University Press.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In G. D. . M.A., J. S. Sninsky, & T. J. White, eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York, USA: Academic Press.
- Widden, P., 1997. Competition and the fungal community. In D. B. Wicklow & Sönderström, eds. *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Alemania: Springer-Verlang, pp. 135–147.
- Wilson, D., 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73, p.274–276.
- Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K., Hyakumachi, M. & Shiraishi, T., 2011. *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J. Gen. Plant Pathol.*, 77(6), p.336–341.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Xia, Z., Shao, L., Zhang, K. & Li, G., 2012. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *J. Asia. Pac. Entomol.*, 15(4), p.647–650.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. & Qin, L., 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol. Res.*, 165(6), p.437–49.
- Yuen, T.K., Hyde, K.D. & Hodgkiss, I.J., 1999. Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microb. Ecol.*, 37, p.257–262.

Zhang, L., Kang, Z., Xu, J., Xu, W. & Zhang, J., 2010. Isolation and structural identification of herbicidal toxin fractions produced by *Pythium aphanidermatum*. *Agric. Sci. China*, 9(7), p.995–1000.

Zhi-Lin, Y., Yi-Cun, C., Bai-Ge, X. & Chu-Long, Z., 2012. Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 32(4), p.363–73.

Páginas de internet:

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM

<<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>>

BioEdit *Biological sequence alignment editor* para Windows

95/98/NT/2000/XP/7. <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>

Oliveros, J.C., 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams.

<<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>

Libro del Web de Química del NIST. <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>

X. Anexo I

Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y crecimiento de los hongos endófitos y fitopatógenos

- Papa Dextrosa Agar (PDA)

200 g de papas, 20 g de dextrosa, 15 g de agar en 1000 mL de agua destilada. Se hirvió durante 20 minutos la papa fresca previamente pelada y cortada cubos, posteriormente, la infusión de papa se filtró a través gasa y se le agregó la dextrosa y el agar, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa & Hanlin 1978).

- Agar-Agua (AA)

20 g de agar en 1000 mL de agua destilada.

- Avena Agar (OA)

20 g de avena Quaker®, 30 g de agar y 500 mg de cloranfenicol en 1000 mL de agua destilada. Se hirvió la avena con la menor cantidad posible de agua destilada durante 10 min, adicionar el agar, el cloranfenicol y agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa & Hanlin 1978).

- Caldo Papa Dextrosa (CPD)

200 g de papas, 20 g de dextrosa en 1000 mL agua destilada. Se hirvió durante 20 minutos la papa fresca pelada y cortada cubos, posteriormente, la infusión de papa se filtró a través gasa y se le agregó la dextrosa, por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Leslie & Summerell, 2006).

- Medio Arroz (MA)

Lavar 300 g de arroz con agua corriente y, posteriormente con agua destilada. Añadir 300 mL de agua destilada (Sandoval Espinosa, 2014).

*Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*

Rosa Elvira Sánchez-Fernández¹ · Daniel Diaz² · Georgina Duarte³ · Patricia Lappe-Oliveras⁴ · Sergio Sánchez⁵ · Martha Lydia Macías-Rubalcava¹

Received: 15 June 2015 / Accepted: 15 September 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract This study demonstrates volatile organic compounds (VOCs) production as one of the defense mechanisms of the antagonistic endophyte *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, and the volatile changes in two times of the fungal growth; and, as result of its intra and interspecific interactions with the plant pathogen *Pythium aphanidermatum*. The antifungal activity of the volatile and diffusible metabolites was evaluated by means of three types of antagonism bioassays and by organic extract agar dilution. VOCs were obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry from 3- and 5-day *Nodulisporium* sp. cultures, as well as from its interspecific in vitro antagonistic interaction with the oomycete *P. aphanidermatum*, and its intraspecific *Nodulisporium* sp.–*Nodulisporium* sp. interaction. The GS4d2II1a strain completely inhibited the growth of

two fungi and seven oomycetes by replacing their mycelia in simple antagonism bioassays and by producing in vitro volatile and diffusible metabolites that acted synergistically in multiple antagonism bioassays. Additionally, VOCs inhibited the growth of three oomycetes and one fungus in antagonism bioassays using divided plates. A total of 70 VOCs were detected, mainly including mono and sesquiterpenes, especially eucalyptol and limonene. Multiple correspondence analysis revealed four different volatile profiles, showing that volatiles changed with the fungus age and its intra and interspecific interactions. The metabolites produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a could be useful for biological control of fungal and oomycetes plant pathogens of economically important crops.

Keywords Endophytic fungus · *Nodulisporium* sp. · *Hypoxylon anthochroum* · Antifungal · VOCs · Interspecific interaction

✉ Martha Lydia Macías-Rubalcava
mmacias@iquimica.unam.mx

- ¹ Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F. 04510, Mexico
- ² Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F. 04510, Mexico
- ³ Facultad de Química, Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F. 04510, Mexico
- ⁴ Instituto de Biología, Departamento de Botánica, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F. 04510, Mexico
- ⁵ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F. 04510, Mexico

Introduction

Many microorganisms generate a variety of volatile organic compounds (VOCs) with biological activity. Among them, fungi produce volatile compounds with antifungal activity that have potential applications in medicine, industry, and in agriculture [1]. Endophytic fungi–microorganisms that live inside plant tissues without causing disease symptoms or displaying outward signs of habitation are capable to produce secondary metabolites with antibiotic activity, such as, nonvolatile and volatile compounds [2, 3]. Fungal volatiles mediate ecological relationships such as intra and interspecific communication and as defense compounds [4, 5]. In addition, endophytic

fungi could protect the host plant by producing nonvolatile and volatile compounds with antifungal activity against plant pathogens, and by mycoparasitism and predation that limits the pathogen growth. In addition, these mechanisms could be responsible for their survival inside the plant [6, 7]. Recently, the study of endophytic fungi has acquired great relevance as a promising approach for the detection of volatile compounds, which can be used as biological control or as mycofumigant agents in pest management for crop protection against fungal plant pathogens [1, 8, 9].

In vitro studies with interacting fungi show that they produce primary and secondary antifungal metabolites such as enzymes, diffusible compounds, and volatile compounds that inhibit the fungal competitor at distance [10]. The interaction zone of the fungal antagonism also involves dead hyphae by mycoparasitism, pigments, and morphology changes of the mycelia [6, 11]. The fungus VOC profiles in these antagonistic interactions, may change qualitatively, quantitatively or both during inter- and intraspecific interactions [12]. VOCs profiles also change in antagonistic interactions between fungi and bacteria [5, 13].

There are some reports about changes in volatile production in interspecific interactions between saprobe and wood rotting basidiomycetes [12, 14], and between bacteria and fungi [5], when exploring the ecological role of volatile compounds produced by fungi and their possible application in agriculture. However, up to date, there are no reports on changes in the production of volatile compounds between an endophytic fungus and an oomycete plant pathogen in antagonistic interactions, since the metabolites produced are probably responsible for the biological activity observed in co-culture; generally, this bioactivity is attributed to the endophyte secondary metabolites produced when is cultivated under axenic monoculture conditions.

The fungal genus *Hypoxylon* and its anamorph, *Nodulisporium*, are members of the Xylariaceae family (Phylum Ascomycota), and are producers of antimicrobial VOCs. The compounds produced by *Nodulisporium* spp. include alcohols, carboxylic acids, esters, and monoterpenes which have antifungal activity against plant pathogens [15–20].

Herein, we describe an endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. strain GS4d2III1a, isolated from *Gliricidia sepium* (Fabaceae), which produces antifungal VOCs that change in antagonistic interaction. With this study, we attempt to demonstrate that VOCs production is one of the defense mechanisms of the antagonistic endophyte *Nodulisporium* sp. GS4d2III1a, and how these VOCs change in intra and interspecific interactions. The metabolites produced by the GS4d2III1a strain could be useful in the biological control of plant pathogens and therefore emerge as a possible alternative to fungicides with lower environmental impact.

Materials and Methods

Fungal Isolation

The endophytic fungus GS4d2III1a was isolated from healthy leaves of *G. sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. (1842) (Fabaceae) following the protocol reported by Rodrigues [21]. Leaves were collected in the Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH), located in the Rio Balsas basin, Quilamula (8° 30' 4.1" N–98° 51' 52" W and 18° 32' 12.2" N–99° 02' 05" W 1080–1230 masl), Morelos, México, in September 2010. Leaves were washed with both running and distilled water, and were surface sterilized with the following solutions: 75 % ethanol for 60 s, 3.4 % sodium hypochlorite (65 % Clorox®) for 60 s, and washed with sterile distilled water between solutions and at the end. The surface-sterilized leaves were dried with sterile adsorbent paper; cut into 2×2 mm pieces at the central vein level of each leaf. Four pieces were placed onto potato–dextrose–agar (PDA) and distilled water–agar (WA) plates. Chloramphenicol (500 mg/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to both media to inhibit bacterial growth. Plates were incubated at 25 °C in photoperiod of 12:12 h light–dark with a fluorescent light. Plates were observed daily and emerging colonies were re-inoculated in new PDA plates until pure cultures were obtained.

The purified strain GS4d2III1a is preserved in PDA slants at the Instituto de Química, UNAM. They are also maintained in WA (0.2 %) at 4 °C and in 30 % glycerol–potato–dextrose broth (PDB) at –80 °C at the Laboratorio de Micología C006, Instituto de Biología, UNAM. Dried PDA and oatmeal agar (OA) cultures are deposited in the Herbario Nacional de México (MEXU), UNAM, with the collection number MEXU 27-541.

Morphological and Molecular Identification

Morphological observations and sequencing of the ITS1-5.8-ITS2 region were used for taxonomic identification. For examination of macro- and micromorphological characteristics, the strain GS4d2III1a was grown onto OA and PDA plates at 27 °C in darkness for 2 weeks. Cultures were observed daily to measure growth rate and for colony description according to the protocols of Ellis [22] and Ju and Rogers [23]. Anamorphic structures were observed, measured, and photographed with a brightfield microscope; colony and pigment colors were determined with the Methuen Handbook of Colour [24]. The strain was identified as *Nodulisporium* sp. by its macro- and microscopic features and following the keys and diagnosis of Ellis [22] and Ju and Rogers [23].

This identity was confirmed by sequence analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the forward primer ITS1F (5'-

CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA-3') [25], and the reverse primer ITS4-A (5'-CGCCGTTACTGGGG CAATCCCTG-3') [26]. For this purpose, total genomic DNA was extracted from a 5 days culture in PDB, incubated at 29 °C at 180 rpm, following the modified protocol by Akins and Lambowitz [27]. The PCR reaction was carried out in 50 µl reaction volume containing 5 µl 1× PCR Buffer 10× (Invitrogen); 1.25 mM of each dNTP (Invitrogen); 2 mM MgCl₂, 25 pM each primer, 300 ng (150 ng/ml) genomic DNA, and 1 U Taq polymerase (Invitrogen). DNA amplification was performed in a Thermal Cycler PCR (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, CA, USA) consisting of an initial denaturing step at 94 °C for 1 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 45 s at 52 °C; 1 min at 68 °C, and a final extension step for 10 min at 68 °C. PCR amplification product was separated by electrophoresis in 0.8 % (w/v) agarose gel (Invitrogen), stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in 1× Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer, at 90 V for 40 min; and, visualized under a UV transilluminator (UVP Dual-Intensity Transilluminator, Upland, CA, USA). The fragment size was estimated by comparison with a TrackIt 100 pb ladder (Invitrogen) [28]. The sequence was obtained from Laragen Inc. (UT, USA). Alignment and editing were done with BioEditProgram v 7.0.5. The edited sequence was aligned in the GenBank database using BLASTN program [29], and deposited. The GenBank accession number of the *Nodulisporium* sp. GS4s2II1a sequence is depicted in the “Results” section.

Simple Direct Antagonism Bioassays with Plant Pathogenic Oomycetes and Fungi

The fungus *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and the plant pathogenic microorganisms were paired opposite to each other in 9 cm Petri dishes with PDA. The endophyte inoculum was placed on the medium 3 days before the antagonism bioassay. The plant pathogens utilized were: the oomycetes *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium polytylum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, and *Phytophthora parasitica*, in addition to the fungi *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani* [30]. The microorganisms were incubated at 28 °C in 12:12 h light–dark photoperiod and the outcome of the interactions was determined after 22 days. The main considered outcomes were: (1) inhibition at distance, where the competitor’s mycelia did not meet; (2) partial replacement, where the *Nodulisporium* strain grew over its competitor but the mycelium never reach the opposite side of the plate; (3) replacement, where the *Nodulisporium* strain completely grew over its competitor [11]. Percent of inhibition was determined at 4, 8, 11, and 22 days of incubation by measuring the radius of each mycelium near the interaction zone (defined as *a*), and compared to their respective controls that are within the radius

of the mycelium, far from the interaction zone (defined as *b*) with the following equation: $\left| \frac{a-b}{b} \right| \times 100$. In order to confirm whether or not *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a could kill the plant pathogens, the recovery of these pathogens was evaluated from a 22-day antagonistic interaction assay by transferring an inoculum (5 mm) of the interaction zone with *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a to a new Petri dish with PDA, and incubating it under the same conditions. The growth of the plant pathogens, of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, or both, was observed after 8 days incubation.

Multiple Direct Antagonism Bioassays with Plant Pathogenic Oomycetes and Fungi

Nodulisporium sp. GS4d2II1a is a fungus of rapid growth; therefore, to determine if this fungus can inhibit the growth of the plant pathogens at distance, possibly due to VOCs production, we performed multiple antagonism bioassays using 15 cm PDA plates with four 5-mm diameter inocula of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Initially, the *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a inocula was placed at the center of the plate and was grown at 28 °C for 3 (*Nod3*), 5 (*Nod5*), 7, and during 9 days. At each incubation time, the oomycetes and fungi were inoculated around the *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a colonies and at the edge of the plate. After inoculation, these plates were re-incubated under similar conditions. The plant pathogens tested were the same used in the simple direct antagonism assays. The outcome of the interactions and percentage of inhibition were determined at 2, 4, 6, and 8 days of antagonism. The percent of inhibition was calculated by measuring the radius of each mycelium and comparing this with their respective controls. Control cultures consisted of PDA plates inoculated with only the plant pathogens, under the same conditions.

Antagonism Bioassays with Plant Pathogenic Oomycetes and Fungi in Divided Petri Dishes

Bioassays were performed in 9-cm divided Petri plates with the two compartments containing 10 mL PDA. The plate dividing wall prevented the diffusion of the soluble compounds produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, but did allow the free exchange of VOCs [31]. Antifungal activity of VOCs was tested against the plant pathogenic microorganisms *P. aphanidermatum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *F. oxysporum*, and *A. solani* at three incubation times of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a growth. An inoculum of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a was placed in one of the compartments of the plate and incubated at 28 °C in 12:12 h light–dark photoperiod, for 3, 5, and 7 days before the bioassay. The inoculum from the plant pathogenic fungi and oomycetes was then placed in the other dish compartment. The plate was sealed with Parafilm® and incubated as above. The bioassays

were made by triplicate. Control cultures were obtained by growing each plant pathogen alone, under the same conditions. Results of the bioassays were observed for 7 days. Percentages of growth inhibition were calculated after 2, 3, 4, and 7 days of antagonistic interaction by measuring the colony diameter of the each plant pathogenic fungi and oomycete and comparing with the respective controls [31].

Cultures of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and Obtaining of the Secondary Metabolites

Cultures of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a were performed on 15-cm PDA plates containing 50 ml of culture medium. The inoculum consisted of a 5-mm diameter agar plug of the growing periphery of an 8-day culture of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a growing in PDA and then placed on the center of 10 PDA plates. Plates were incubated for three weeks at 28 °C in a 12:12 h light–dark photoperiod under fluorescent light. At the end of the incubation time, the mycelia were fragmented into small pieces and extracted with dichloromethane CH₂Cl₂ (500 ml×3). The organic phase was filtered over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo. The extract obtained was a brown solid with a yield of 51.22 mg/50 ml of PDA.

Determination of Antifungal Activity of the Secondary Metabolites Against Plant Pathogenic Fungi and Fungoids

The antifungal bioassay with the dichloromethane extract was carried out with the plant pathogens *P. ultimum*, *P. capsici*, *A. solani*, and *F. oxysporum*. The extract was evaluated at 250 µg/ml on the radial growth of the microorganisms by dissolving the extract in 300 µl of methanol, and diluting this in PDA plates by quadruplicate. Plates were inoculated with a 5-mm diameter agar plug of each microorganism and incubated at 28 °C in 12:12 h light–dark photoperiod. The commercial fungicides Ridomil 4E® (Metalaxyl: 2-[(2,6-dimethylphenyl)-(2-methoxy-acetyl)-amino]-propionic acid methyl ester), and Prozar® (carbendazim: methyl benzimidazol-2-yl-carbamate), for fungoids and fungi, respectively, were used as positive controls. Plates with PDA and PDA with 300 µl of methanol were used as negative controls. Percent of inhibition were calculated after 4 days incubation of the plant pathogens by measuring the mycelium diameter of each microorganism and comparing with the controls [32].

Qualitative Analysis of VOCs

The analysis of VOCs was carried out in solid phase micro extraction (SPME) vials with a polypropylene hole-cap and PTFE/coated silicone septa, containing 15 ml PDA. In order to tentatively identify the VOCs responsible of the biological activity, and to determine their changes when *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a is interacting with a plant pathogen, we

performed VOCs identification by triplicate under the following conditions: (1) A *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a culture, grown for 3 days (*Nod3*); (2), another culture grown for 5 days (*Nod5*); (3) a *P. aphanidermatum* culture grown for 2 days. For intra- and interspecific interactions: (4) a 5-day antagonistic interaction of two *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a inocula, placed 2 cm apart (*Nod-Nod*); and (5) a *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a inoculum placed in a SPME vial and, after 3 days incubation, a *P. aphanidermatum* inoculum placed 2 cm apart (*Nod-Pyt*). The *Nod-Pyt* VOCs analysis was performed after 2 days of antagonistic interaction. The inoculum size was 5 mm diameter from 3 days culture of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (*Nod3*), and 1-day culture of *P. aphanidermatum*.

VOCs in the headspace (HS) of the treatments were obtained by SPME. The SPME fiber (2 cm, 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS fiber, Supelco Bellefonte, PA, USA) was conditioned for 40 min at 250 °C, placed in the HS of the vials and exposed to the vapor phase during 60 min. The fiber was directly inserted into the Agilent 6890N series GC inlet (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA), at 300 °C, splitless mode. The desorption time was 2 min, and the desorbed compounds were separated on a 10 m×0.18 mm×0.18 µm, DB-5MS capillary column, using the following GC oven temperature program: 3 min at 40 °C up to 300 °C during 5 min, at 20 °C/min. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. The GC was coupled to a LECO time of flight mass spectrometer (MS-TOF, Leco Corporation, St. Joseph, MI, USA) operating at unit resolution. The electronic ionization energy was 70 eV, and the mass range scanned was 33–500 uma. Scan rate was 20 spec/s. Transfer line and ionization chamber temperatures were 250 °C and 200 °C respectively. Data acquisition and processing were performed with LECO ChromaTOF™ software system. The volatile compounds were tentatively identified based on their MS fragmentation patterns and Kovats Index, calculated in relation to the retention times of a series of alkanes (C₈–C₂₀). Both were compared with chemical compounds data gathered by Adams [33] and the spectral database of the National Institute of Standards and Technology (NIST). Conclusive identification was made by comparing the MS and Kovats Index of compounds with available authentic standards purchased from Sigma-Aldrich (≥98 % purity). The authentic standards were: 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, β-pinene, α-terpinene, eucalyptol, limonene, o-cymene, γ-terpinene and β-caryophyllene, as shown in Table 3. Since the objective was not the determination of absolute quantities of each compound, we determined the relative amounts of individual components of the treatments. The relative quantities were expressed as percentages of the peak area within the total peak area and as an average of the three replicates.

In order to evaluate the metabolites present in the culture medium, comparable analyses were performed with vials

containing only PDA, and the identified compounds were removed from the data analyses.

Statistical Analysis

Experimental results regarding plant pathogens inhibition in the antagonism bioassays were analyzed by *t*-tests utilizing GraphPad Prism ver. 6.0 statistical computer software (GraphPad software, La Joya, CA, USA). Experimental results considering the inhibitory effect of the extract were analyzed by analysis of variance (ANOVA, $\alpha=0.05$), and Tukey statistical tests using the GraphPad Prism ver. 6.0 statistical software [31]. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD). A *P* value of <0.05 (*) was used to indicate statistical significance.

We visualized in a Venn diagram the distribution of the VOCs produced by the treatments [5, 34]. However, due to the complexity in the VOCs profiles induced by the experimental conditions, the results provided by the Venn diagram were difficult to describe. Therefore, we performed a multiple correspondence analysis (MCA) [35, 36] to separate and compare the volatile profiles produced between treatments. MCA was used to determine the treatment-specific profile of VOCs production according to their diversity of chemical families (i.e., monoterpenes, alkanes, ketones, etc.), and relative abundance (low, medium, or high). Additionally, we assessed the VOCs profile of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and its possible changes associated to time and the kind of interaction. For the model, we included the treatment (*Nod3*, *Nod5*, *Nod-Nod*, and *Nod-Pyt*); the VOCs shared between two, three, or four treatments, altogether with the chemical family and the relative abundance of those compounds found exclusively on one treatment. For the relative content of VOCs, we used percentile distribution for each experimental condition, and separated the compounds into low (<33.3 %), medium (33.3–66.7 %), and high (>66.7 %) relative area percentage. MCA was performed using Statistical Analysis Software (SAS 9.0, SAS Institute, Cary, NC, USA), and graphs were constructed with Prism 6.0 (GraphPad software, La Joya, CA, USA).

Results

Fungal Identification

According to its macro- and micromorphological features, the strain GS4d2II1a was identified as *Nodulisporium* sp. [22, 23].

Nodulisporium strain GS4d2II1a presented the following cultural and morphological characteristics. The colony grown on PDA at 28 °C showed a fast growth and covered a 8.5 cm Petri dish in 1 week; with a growth rate of 10.42 cm²/day; it was at first whitish (M5A1), becoming buff brown (M6E3) with sporulation, velvety, reverse dark brown (M7F3).

Sporulation was restricted to the center of the colony (Fig. 1a). Conidiophores were macronematous, momonematous, penicilliate branched toward the apex, hyaline to light brown, smooth to finely roughened, 1.5–2 mm; conidiogenous cells were hyaline to light brown (7.8–21 \times 2.5–3.8 μ m), and bore smooth, ellipsoidal or ovoid, light brown to brown one-celled conidia (5–7.5 \times 2.7–2.7 μ m) (Fig. 1b–e).

The colony on OA incubated at 28 °C in darkness grew slower than in PDA, covering the Petri dish in 2 weeks. Mycelium was white, becoming brown (M6E5) with sporulation, reverse uncolored. Sporulation was present over the entire surface of the colony. Conidiogenous structure *Nodulisporium*-like had a central axis and additional branches, resulting in a complex structure; it was from hyaline to yellowish and from smooth to finely roughen. Conidiogenous cells and conidia were similar in shape and size to those described in PDA.

While morphological features depicted the anamorphic stage of the isolate as *Nodulisporium* sp., comparison of the ITS1-5.8-ITS2 sequence into the GenBank database gave the highest similarity (99 %) with the species *Hypoxyylon anthochroum* (accession no. KF192825 and JN660819, with 95 % coverage), and *Hypoxyylon griseobrunneum* (accession no. KC968928, with 96 % coverage), whose anamorphic state is *Nodulisporium*. GenBank accession number of the ITS1-5.8-ITS2 sequence of the GS4d2II1a strain is KM516709.

However, the macro and microscopic morphology, with its *Nodulisporium*-like branch pattern, supports the identification of the GS4d2II1a strain as *Nodulisporium* sp., anamorph of *H. anthochroum*, and not of *H. griseobrunneum* that presents a *Vigariella*-like conidiogenous structure [23, 37].

Direct Antagonism Bioassays with Plant Pathogenic Oomycetes and Fungi

In the direct confrontation bioassay, the *Nodulisporium* GS4d2II1a strain first inhibited the growth of the plant pathogens with or without direct contact of their mycelia, followed by growth of its mycelia over the pathogens colony. After 4 days of antagonistic interaction, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a totally inhibited growth of *P. capsici*, *P. cinnamomi*, and *P. parasitica*, but did not inhibit *P. aphanidermatum*. Then, after 8 days interaction, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a grew over the pathogens colonies (partial replacement), and totally inhibited to *P. ultimum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *F. oxysporum* and *A. solani*, while partially affecting the growth of *P. aphanidermatum* (15 %). Finally, after 11 days incubation, and up to 22 days of interaction, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a completely replaced six of the nine pathogens tested: *P. aphanidermatum*, *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, and *A. solani* (Table 1).

Fig. 1 *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a anamorph of *H. anthochroum*. **a** Colony on potato-dextrose-agar (PDA) after 7 days of growth at 28 °C. **b, c** Penicilliate branched conidiophores, smooth or slightly roughened; **d** conidiogenous cells bearing smooth, ellipsoidal or ovoid, light brown to brown conidia, stained with lactofuchsin, $\times 750$; **e** conidiogenous cells with ovoid conidia, stained with lactofuchsin, $\times 950$

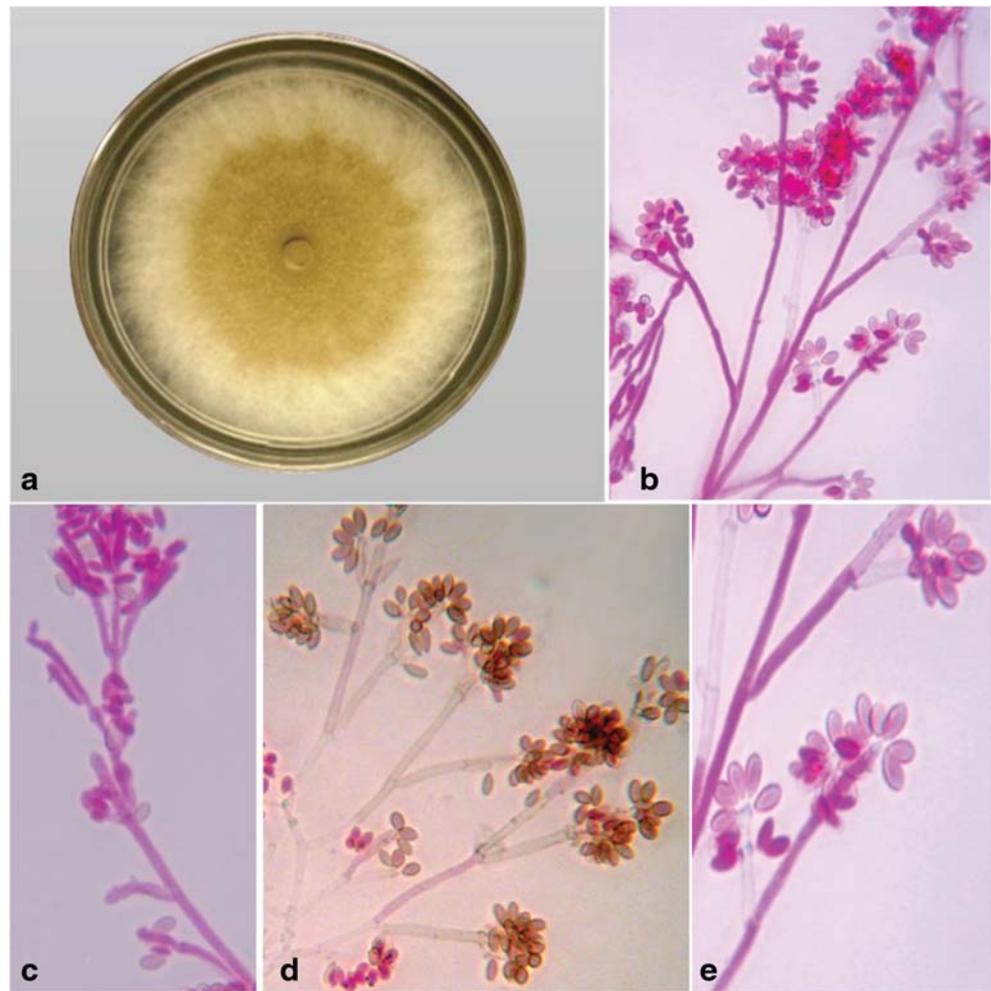


Table 1 Percent of inhibition and outcome in the direct antagonisms bioassays between *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and plant pathogenic fungi and oomycetes

Plant pathogen	% Inhibition			Outcome of interaction ^a	Recovery after 8 days
	4 days	8 days	11 days		
<i>Pythium aphanidermatum</i>	-1.7 ± 14.4^b	15.0 ± 0.0	$100.0 \pm 0.0^*$	Replacement	No
<i>Pythium ultimum</i>	$62.5 \pm 3.5^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Partial replacement	Yes
<i>Pythium polytylum</i>	$87.5 \pm 3.5^*$	$73.3 \pm 2.8^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Partial replacement	Yes
<i>Phytophthora capsici</i>	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Replacement	No
<i>Phytophthora palmivora</i>	$45.0 \pm 0.0^*$	$82.5 \pm 3.5^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Replacement	Yes
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Replacement	No
<i>Phytophthora parasitica</i>	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Replacement	No
<i>Fusarium oxysporum</i>	$73.3 \pm 2.8^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Partial replacement	Yes
<i>Alternaria solani</i>	$72.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	$100.0 \pm 0.0^*$	Replacement	Yes

^a Outcome determined at 22 days of antagonistic interaction: inhibition at distance, where the competitors mycelia did not meet; partial replacement, where the endophytic *Nodulisporium* GS4d2II1a grew over its competitor but the mycelium never reach the opposite side of the plate; replacement, where the endophytic *Nodulisporium* GS4d2II1a completely grew over its competitor [11]. Percent of inhibition is showed as means with standard deviation ($n=3$). $*P < 0.05$

^b Negative values mean growth stimulation

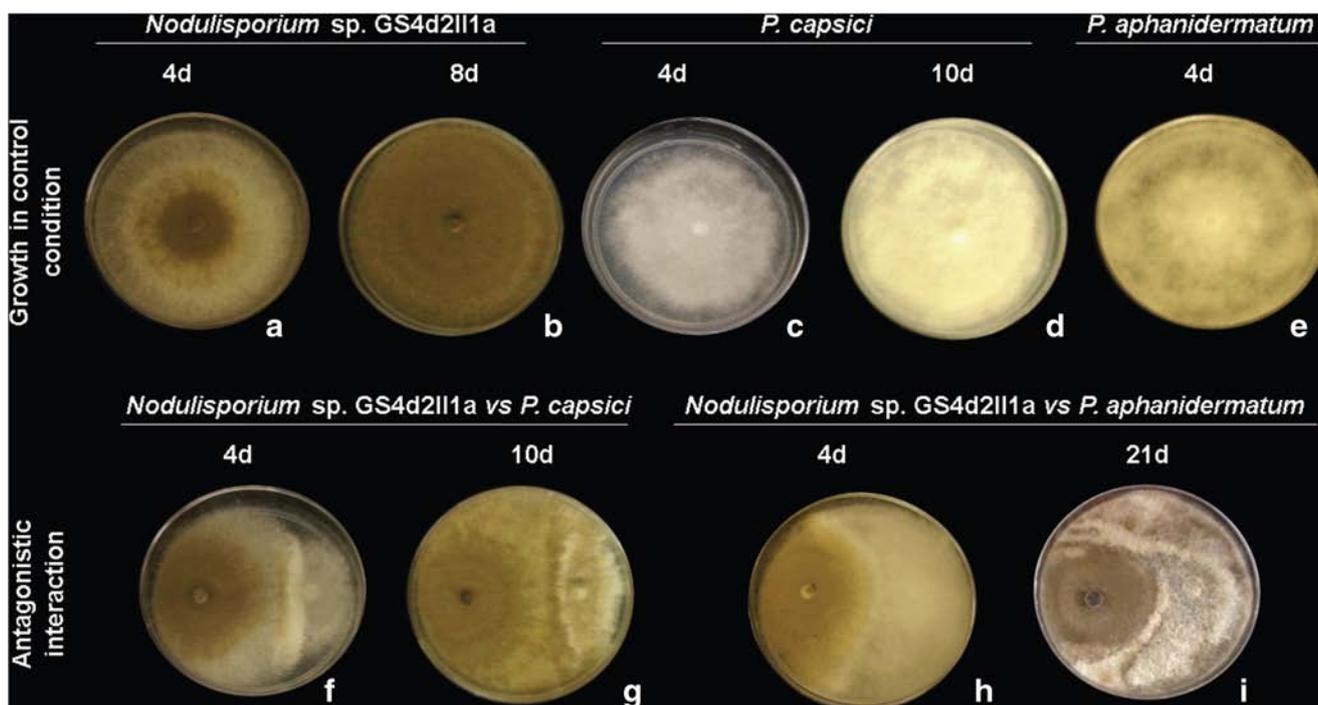


Fig. 2 Colonies of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, *P. capsici* and *P. aphanidermatum* at different days of growth, and replacement of *P. capsici* and *P. aphanidermatum* by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a at 4 (a) and 8 days (b) of growth. *P. capsici* at 4 (c) and 10 days (d) of growth. *P. aphanidermatum* at

4 days of growth (e). *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a growing over *P. capsici* at 4 (f) and 10 days (g) of antagonistic interaction. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a growing over *P. aphanidermatum* at 4 (h) and 21 days (i) of antagonistic interaction

Figure 2 shows *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a colonies grown for 4 (Fig. 2a) and 8 (Fig. 2b) days; *P. capsici* colonies grown for 4 (Fig. 2c) and 10 (Fig. 2d) days; and *P. aphanidermatum* colony at 4 days (Fig. 2e) of growth. Figure 2 also shows the antagonistic interaction between *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a with *P. capsici* at 4 (Fig. 2f) and 10 (Fig. 2g) days, and with *P. aphanidermatum* at 4 (Fig. 2h) and 21 days (Fig. 2i), where it is evident how *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a overgrows on both pathogens.

Additionally, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a killed the oomycetes *P. aphanidermatum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, and *P. parasitica*, since they were not recovered; and, in the direct antagonism bioassays, the mycelium of those pathogens was replaced by the endophyte. In addition, although *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a partially (*P. ultimum*, *P. polytulum*, and *F. oxysporum*) or totally (*P. palmivora* and *A. solani*) replaced the mycelia of the pathogens, it did not kill them but inhibited their growth (Table 1).

Multiple Direct Antagonism Bioassays with Plant Pathogenic Oomycetes and Fungi

The antifungal activity of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a was present after 3 and 5 days of growth, and reached its maximum inhibitory effect after 5 days of incubation; therefore, only the

corresponding percent of inhibition at these two culture times is presented.

From 2 to 6 days of incubation in the antagonistic interaction, between *Nod3* or *Nod5* and the plant pathogens, the endophyte inhibited growth of the pathogens at distance. This was probably due to the VOCs with antifungal properties production. After 2 days of antagonistic interaction, between the *Nod3* culture and the pathogens, *Nod3* mainly reduced the growth of *A. solani* (25.4 %). After 4 days, it mainly inhibited to *P. aphanidermatum* (49.2 %) and *F. oxysporum* (32.0 %). After 6 days of antagonistic interaction, the highest suppression effect of *Nod3* was observed on *F. oxysporum* (73.8 %) and on *P. aphanidermatum* (62.6 %); and, after 8 days *A. solani* (75.4 %), *F. oxysporum* (72.5 %), and *P. aphanidermatum* (72.6 %) were the most affected. However, at this time of interaction there were mycelial contact between these colonies and *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (Table 2). Finally, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a kept growing in all samples until the colony met the nine plant pathogen colonies and began to grow over them.

On the other hand, *Nod5* inhibited at distance the competitors, but also limited its own growth. The reduction of the plant pathogens growth at distance, after 2 days of antagonistic interaction, was significant,

Table 2 Percent of inhibition at 2, 4, 6 and 8 days of antagonistic interaction in the multiple direct antagonisms bioassays between *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and plant pathogenic fungi and oomycetes

Plant pathogen	% Inhibition							
	2 days		4 days		6 days		8 days	
	<i>Nod3</i> ^a	<i>Nod5</i> ^b	<i>Nod3</i>	<i>Nod5</i>	<i>Nod3</i>	<i>Nod5</i>	<i>Nod3</i>	<i>Nod5</i>
<i>Pythium aphanidermatum</i>	17.8±5.7*	58.8±6.4*	49.2±0.8*	78.1±4.8*	62.6±4.8*	78.5±4.0*	72.6±13.7*	100.0±0.0*
<i>Pythium ultimum</i>	5.1±4.6	33.3±4.1*	5.6±3.5	39.2±2.8*	33.3±10.4*	30.3±2.6*	50.0±3.1*	100.0±0.0*
<i>Pythium polytylum</i>	4.4±4.0	34.6±13.1*	12.9±5.7	33.3±10.9*	46.9±9.9*	37.3±5.7*	55.9±6.9*	100.0±0.0*
<i>Phytophthora capsici</i>	-6.4±3.4	42.1±5.3*	13.0±6.2	31.4±9.8*	54.4±7.1*	34.5±10.3*	65.9±21.8	100.0±0.0*
<i>Phytophthora palmivora</i>	5.1±11.7	34.8±11.4*	-2.1±3.6	26.9±5.4*	38.7±10.3	28.0±4.8*	49.9±5.6	100.0±0.0*
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	13.6±3.5*	23.7±9.2*	32.0±8.0*	41.0±2.2*	38.1±2.5*	42.6±2.1*	66.7±1.8*	100.0±0.0*
<i>Phytophthora parasitica</i>	10.2±4.4*	31.4±4.2*	24.8±4.6	26.4±6.1	26.6±9.4	30.0±4.1	8.4±11.3	100.0±0.0*
<i>Fusarium oxysporum</i>	19.1±7.3*	38.3±6.8*	32.0±7.0*	35.1±6.5*	73.8±9.8*	67.0±6.6*	72.5±6.8*	100.0±0.0*
<i>Alternaria solani</i>	25.4±10.7*	38.3±6.8*	23.0±9.8	45.8±7.2*	39.8±0.0*	51.0±3.4*	75.4±3.3*	100.0±0.0*

Percent of inhibition is showed as means with standard deviation ($n=3$)

* $P<0.05$

^a*Nod3* *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a 3 days grown

^b*Nod5* *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a 5 days grown

mainly on *P. aphanidermatum* (58.8 %) (Table 2). This reduction continued during several days of antagonistic interaction. At day four, a growth reduction of 45.8, 41.0, and 78.1 % on *A. solani*, *P. cinnamomi* and *P. aphanidermatum*, respectively, was observed. After 6 days a growth inhibition of 67.0 % on *F. oxysporum*, and of 51.0 % on *A. solani*, was detected, and was conserved on *P. aphanidermatum* (78.5 %) (Fig. 3). And, after 8 days of antagonistic interaction, the inhibition was mainly due to contact of mycelia. Figure 3 shows the effect of *Nod5* VOCs production on growth of the plant pathogens after 6 days of antagonistic interaction.

Finally, when *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a was grown for 7 and 9 days, its mycelium almost covered the plate surface and contacted the plant pathogens colonies and rapidly suppressed their growth (data not shown); therefore, these times did not allow observation of the distance inhibition.

Antagonism Bioassays with Plant Pathogenic Oomycetes and Fungi in Divided Petri Dishes

Bioactivity of VOCs was statistically significant ($P<0.05$) after 3 days of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a growth (*Nod3*). It only suppressed *P. parasitica* (29.7±3.7 %), *P. cinnamomi* (18.1±4.3 %), *P. capsici* (25.7±1.2 %), and *F. oxysporum* (21.6±1.0 %) after 3 days of antagonism. VOCs were not active after 5 and 7 days of the fungal culture.

Determination of Antifungal Activity of the Secondary Metabolites from *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a

The dichloromethane extract did not significantly inhibit the growth of the tested microorganisms.

Analysis of VOCs: Similarities and Differences Among Treatments

Nodulisporium sp. GS4d2II1a produced a mixture of volatile secondary metabolites when cultured in vitro for 3 (*Nod3*), and 5 (*Nod5*) days, in interspecific interaction with *P. aphanidermatum* (*Nod-Pyt*), and in intraspecific interaction with other inoculum of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a (*Nod-Nod*). In total, 70 metabolites were detected in four out of the five treatments (*P. aphanidermatum* did not produce VOCs). The VOCs produced were mainly terpenes (mono and sesquiterpenes) that represent at least 63 % of the total. In particular, the monoterpenes were more abundant in *Nod-Pyt*, and the sesquiterpenes in *Nod-Nod* interactions. The VOCs produced in less proportion were alkenes, benzene derivatives, esters, alkanes, alkynes, amines, ketones, alcohols, and carboxylic acids (Fig. 4). Table 3 shows the total number of metabolites detected and listed by retention index (RI). Figure 5 lists the ten VOCs with highest fiber affinity, in each treatment, and their relative content. These metabolites represent 79.7 % in *Nod3*; 59.4 % in *Nod5*, 60.9 % in *Nod-Nod*; and, 72.5 % in *Nod-Pyt* of the total area,

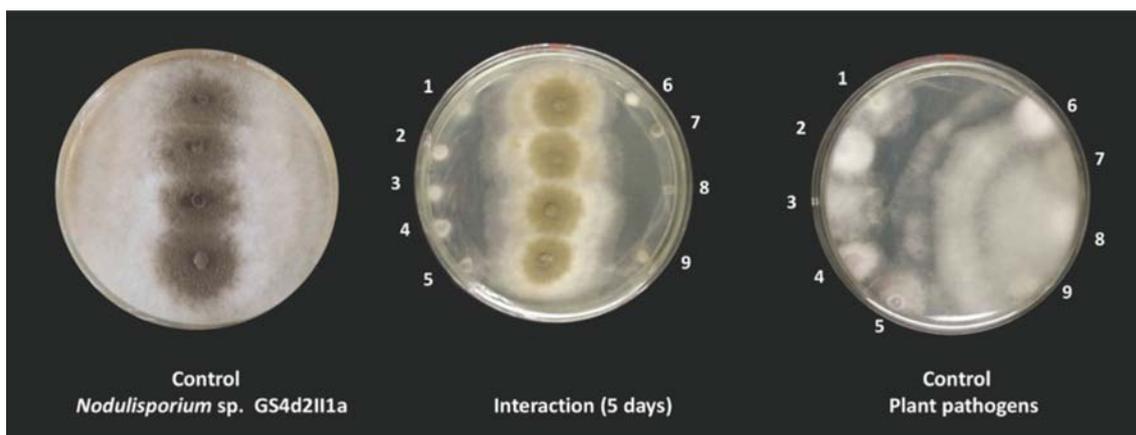


Fig. 3 Multiple direct antagonism bioassay between *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and plant pathogens after 6 days of interaction. (1) *P. cinnamomi*, (2) *P. polytulum*, (3) *P. capsici*, (4) *P. ultimum*, (5) *F. oxysporum*, (6) *P. palmivora*, (7) *A. solani*, (8) *P. aphanidermatum*, (9) *P. parasitica*

where eucalyptol was the compound with the highest affinity in *Nod3* and *Nod-Pyt*, and limonene in *Nod5* and *Nod-Nod*. Additionally, differences among the treatments were evident in the four representative chromatograms, where the peaks number and their areas changed (Fig. 6).

Multiple Correspondence Analysis of VOCs Profiles

The Venn diagram (Fig. 7) revealed a complex pattern of volatile metabolites production between treatments (days of growth and type of interaction), since metabolites were produced exclusively in one treatment or in a mixture of treatments.

Fig. 4 Molecule classification of the volatile metabolites produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and relative content by treatment (%). *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a at 3 days (*Nod3*), and 5 days (*Nod5*), in the intraspecific (*Nod-Nod*) and interspecific interactions with *P. aphanidermatum* (*Nod-Pyt*)

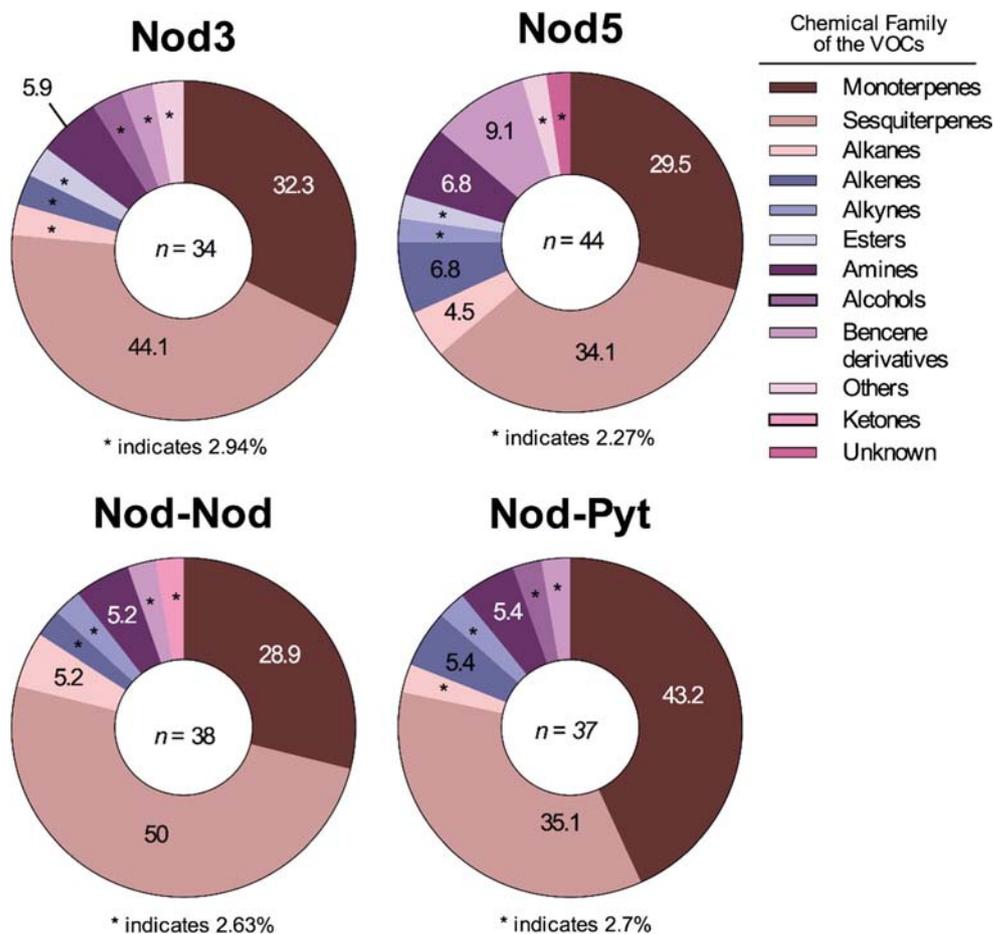


Table 3 VOCs identified in *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a cultures grown for 3 days (*Nod3*) and 5 days (*Nod5*), in the intraspecific interaction (*Nod-Nod*) and in the interspecific interaction with *Pythium aphanidermatum* (*Nod-Pyt*)

ID	Compounds	MW	MF	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Total Area (%)				Identification ^c
						<i>Nod3</i>	<i>Nod5</i>	<i>Nod-Pyt</i>	<i>Nod-Nod</i>	
1	Unidentified amine	185		675.47	–	0.94	x	0.90	1.49	MS
2	Unidentified amine	151		678.24	–	0.43	0.65	1.02	x	MS
3	1 <i>H</i> -Pyrazole	68	C ₃ H ₄ N ₂	680.50	–	x	1.06	x	x	MS
4	Unknown	89		680.55	–	x	1.02	x	x	MS
5	Unidentified ester	142		688.32	–	x	3.02	x	x	MS
6	Tetrahydro-3-methyl-Furan	86	C ₅ H ₁₀ O	690.18	–	x	2.27	x	x	MS
7	Butyl isocyanatoacetate	157	C ₇ H ₁₁ NO ₃	691.68	–	3.66	x	x	x	MS
8	3-Methyl-1-Butanol	88	C ₅ H ₁₂ O	746.93	747	0.04	x	x	x	MS, KI, STD
9	2-Methyl-1-Butanol	88	C ₅ H ₁₂ O	752.24	756	x	x	0.01	x	MS, KI, STD
10	2-Methyl-5-(1-methylethyl)-Bicyclo [3.1.0]hex-2-ene (thujene)	136	C ₁₀ H ₁₆	904.82	930	1.89	1.51	3.69	2.68	MS, KI
11	3-Carene	136	C ₁₀ H ₁₆	905.85	1008	x	1.80	x	x	MS, KI
12	1,2,4-Tris(methylene)-Cyclohexane	120	C ₉ H ₁₂	917.32	–	x	4.02	x	x	MS
13	Methoxy-benzene	108	C ₇ H ₈ O	928.64	917	0.02	0.10	x	x	MS, KI
14	3-Ethylidene-2-methyl-1-Hexen-4-yne	120	C ₉ H ₁₂	935.40	–	x	0.09	0.08	x	MS
15	4-Methylene-1-(1-methylethyl)-Bicyclo [3.1.0]hexane (sabinene)	136	C ₁₀ H ₁₆	956.00	962	0.17	x	0.08	0.09	MS, KI
16	2,6-Dimethyl-2,6-Octadiene	138	C ₁₀ H ₁₈	973.80	990	0.02	0.18	0.19	x	MS, KI
17	α-Myrcene	136	C ₁₀ H ₁₆	981.00	990	1.75	x	x	3.07	MS, KI
18	6,6-Dimethyl-2-methylene-Bicyclo [3.1.1]heptane (β-pinene)	136	C ₁₀ H ₁₆	983.20	979	x	4.83	4.06	3.23	MS, KI, STD
19	2-Pentylfuran	138	C ₉ H ₁₄ O	989.60	988	0.11	0.16	0.19	0.32	MS, KI
20	5-Methylenecycloocta-1,3-diene	120	C ₉ H ₁₂	995.00	–	x	0.12	0.15	0.68	MS
21	α-Phellandrene	136	C ₁₀ H ₁₆	999.00	1002	0.41	0.54	1.85	2.27	MS, KI
22	Indane	118	C ₉ H ₁₀	1005.20	1028	x	x	x	0.15	MS, KI
23	1-Ethenyl-2-methyl-Benzene	118	C ₉ H ₁₀	1005.90	–	x	0.12	x	x	MS
24	1-Methyl-4-(1-methylethyl)-1,3-Cyclohexadiene (α-terpinene)	136	C ₁₀ H ₁₆	1012.60	1017	0.64	2.87	2.20	2.58	MS, KI, STD
25	2-Methyl-5-(1-methylethyl)-Bicyclo [3.1.0]hex-3-en-2-ol	152	C ₁₀ H ₁₆ O	1012.70	1039	x	1.06	x	x	MS, KI
26	4-Carene	136	C ₁₀ H ₁₆	1018.20	1014	x	x	1.18	x	MS, KI
27	Unidentified amine	149	C ₁₀ H ₁₅ N	1016.60	–	x	1.03	x	x	MS
28	Eucalyptol	154	C ₁₀ H ₁₈ O	1025.90	1026	33.22	6.92	22.58	12.83	MS, KI, STD
29	3-Amino-2,6-dimethoxypyridine	154	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	1027.80	–	x	x	x	0.72	MS
30	Unidentified monoterpene	152	C ₁₀ H ₁₆ O	1028.50	–	5.58	x	x	x	MS
31	2,4-Dimethylcyclohex-1-ene-5-carboxylic acid	154	C ₉ H ₁₄ O ₂	1029.70	–	2.93	x	x	x	MS
32	1-Methyl-3-(1-methylethyl)-Benzene (<i>m</i> -cymene)	134	C ₁₀ H ₁₄	1029.80	1030	9.77	x	4.00	x	MS, KI
33	Limonene	136	C ₁₀ H ₁₆	1031.10	1024	7.61	9.85	13.66	13.16	MS, KI, STD
34	1-Methyl-2-(1-methylethyl)-Benzene (<i>o</i> -cymene)	134	C ₁₀ H ₁₄	1031.80	1022	x	6.86	10.77	x	MS, KI, STD
35	Unknown	154		1034.80	–	x	1.70	x	x	MS
36	1-Methyl-4-(1-methylethyl)-Benzene (<i>p</i> -cymene)	134	C ₁₀ H ₁₄	1037.70	1030	x	0.61	1.53	3.73	MS, KI
37	Unidentified monoterpene	134	C ₁₀ H ₁₄	1041.20	1130	x	x	1.19	x	MS, KI
38	1,8-Nonadiyne	120	C ₉ H ₁₂	1041.60	–	x	x	x	0.82	MS
39	Bicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one	122	C ₈ H ₁₀ O	1042.90	–	x	x	x	0.65	MS
40	3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene (β-ocimene)	136	C ₁₀ H ₁₆	1049.50	1050	x	0.51	0.11	x	MS, KI
41	2,3,4,7-Tetrahydro-1 <i>H</i> -indene	120	C ₉ H ₁₂	1051.00	–	x	1.20	x	x	MS

Table 3 (continued)

ID	Compounds	MW	MF	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Total Area (%)				Identification ^c
						<i>Nod3</i>	<i>Nod5</i>	<i>Nod-Pyt</i>	<i>Nod-Nod</i>	
42	Unidentified monoterpene	136	C ₁₀ H ₁₆	1059.00	–	x	x	1.69	x	MS
43	3,5-Dimethylanisole	136	C ₉ H ₁₂ O	1059.50	–	x	x	1.69	x	MS
44	1-Methyl-4-(1-methylethyl)-1,4-cyclohexadiene (γ -terpinene)	136	C ₁₀ H ₁₆	1060.20	1060	0.85	3.52	3.08	7.70	MS, KI, STD
45	1-Methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene (α -terpinolen)	136	C ₁₀ H ₁₆	1089.40	1088	0.29	1.68	1.35	1.61	MS, KI
46	Caryophyllene-(11)	204	C ₁₅ H ₂₄	1362.30	–	0.30	0.05	x	0.08	MS
47	Unidentified sesquiterpene	204	C ₁₅ H ₂₄	1366.40	–	1.37	0.79	1.05	1.26	MS
48	β -Caryophyllene	204	C ₁₅ H ₂₄	1383.70	1390	1.76	1.18	1.91	1.93	MS, KI, STD
49	1-Ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-Cyclohexane (β -elemene)	204	C ₁₅ H ₂₄	1409.30	1389	0.30	0.75	0.10	0.57	MS, KI
50	Isocaryophyllene	204	C ₁₅ H ₂₄	1440.60	1428	0.33	0.28	0.31	0.52	MS, KI
51	Humullene v1	204	C ₁₅ H ₂₄	1455.40	1433	x	0.82	0.30	0.74	MS, KI
52	α -Humullene	204	C ₁₅ H ₂₄	1479.50	1474	0.38	0.20	0.26	0.40	MS, KI
53	4-Methylene-2,8,8-trimethyl-2-vinyl-Bicyclo[5.2.0]nonane	204	C ₁₅ H ₂₄	1492.00	–	0.15	0.28	0.10	0.33	MS
54	2-Methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-Bicyclo[5.3.0]decane	204	C ₁₅ H ₂₄	1501.20	–	1.42	1.59	1.78	3.02	MS
55	Caryophyllene like	204		1508.80	–	10.98	2.37	5.70	2.23	MS
56	Unknown	176		1512.30	–	x	4.44	x	x	MS
57	Caryophyllene like	204		1513.00	–	x	x	x	4.26	MS
58	Azulene like	204		1513.50	–	x	6.04	x	x	MS
59	1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-Azulene (γ -gurjunene)	204	C ₁₅ H ₂₄	1515.30	1479	x	x	x	4.32	MS, KI
60	2-Isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalene (α -selinene)	204	C ₁₅ H ₂₄	1516.70	1505	x	x	x	1.93	MS, KI
61	Unidentified sesquiterpene	204	C ₁₅ H ₂₄	1524.60	–	1.03	x	x	x	MS
62	Azulene like	205	C ₁₅ H ₂₅	1525.10	–	0.37	x	1.96	x	MS
63	Azulene like	204	C ₁₅ H ₂₄	1525.10	–	x	x	x	5.12	MS
64	1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-Azulene (δ -Guaiene)	204	C ₁₅ H ₂₄	1525.40	1526	1.63	6.47	x	1.35	MS, KI
65	Azulene like	204	C ₁₅ H ₂₄	1526.50	–	x	x	x	1.70	MS
66	Unidentified sesquiterpene	204	C ₁₅ H ₂₄	1527.40	–	x	6.46	x	x	MS
67	Unidentified alkane	150		1529.70	–	x	x	x	1.44	MS
68	2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene	204	C ₁₅ H ₂₄	1539.20	1478	2.21	2.84	2.77	3.33	MS, KI
69	Unidentified sesquiterpene	204	C ₁₅ H ₂₄	1548.80	–	1.66	x	0.59	2.19	MS
70	β -Selinene	204	C ₁₅ H ₂₄	1551.20	1509	1.66	1.85	0.85	3.28	MS, KI

^a RI_{exp} Kovats indices calculated from retention time data on a DB-5MS capillary column

^b RI_{lit} Kovats indices from literature (Adams [34], NIST)

^c Identification by comparison with MS mass spectra, KI Kovats indices from literature, STD authentic standards purchased from Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$ purity), *Nod3* *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a culture grown for 3 days, *Nod5* *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a culture grown for 5 days, *Nod-Pyt* interspecific interaction with *Pythium aphanidermatum*, *Nod-Nod*: intraspecific interaction. (–) The Kovats index was not reported on a DB-5MS capillary column. (x) The compound was not detected in the treatment

Figure 8 shows the VOCs distribution by chemical family, and by relative content (% area: low, medium or high) that uncover the qualitative and quantitative chemical differences

among treatments to provide a clear picture of the VOCs production, based on the volatile profile of each treatment. We observed a profile of VOCs production that varied according

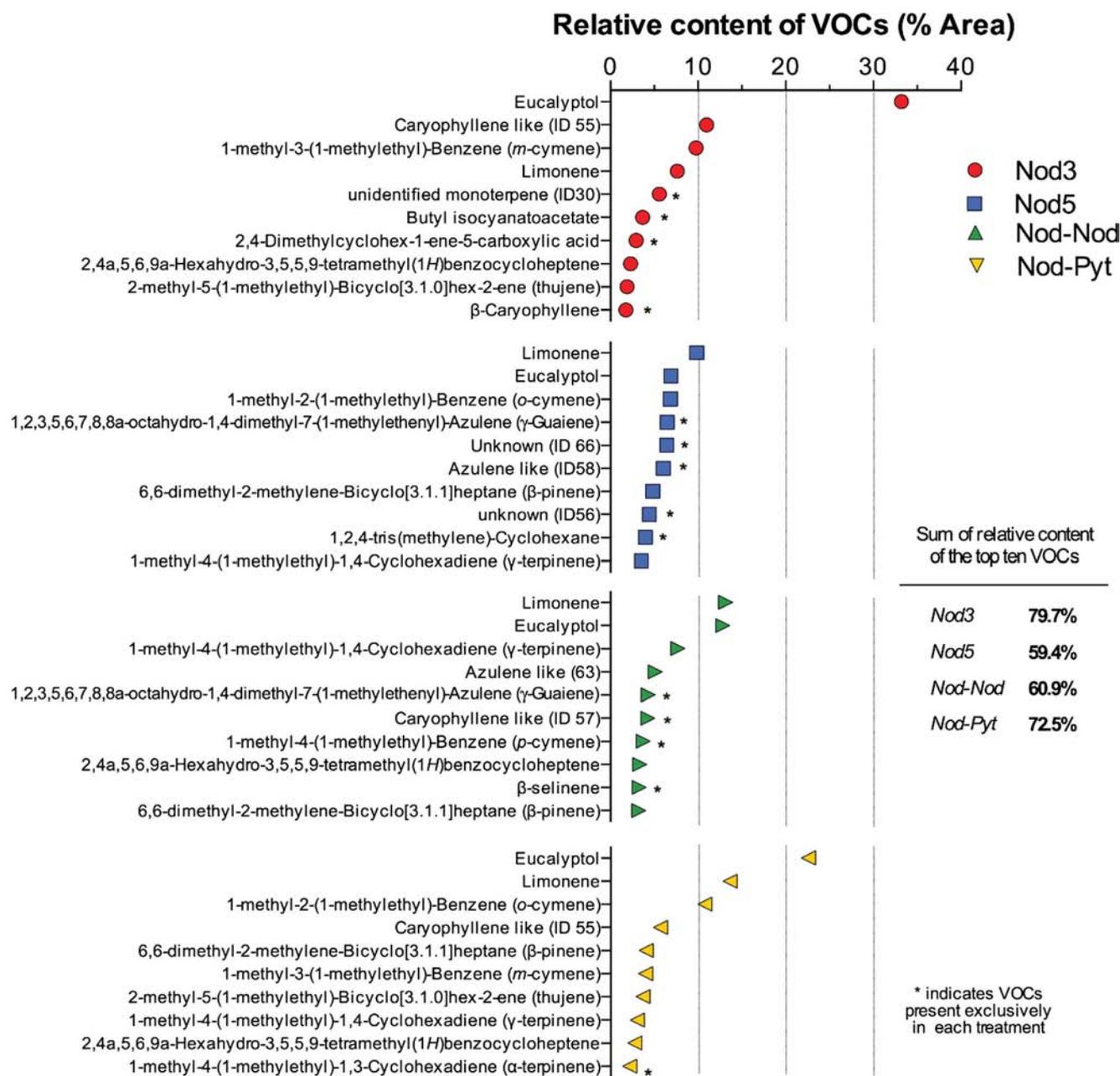


Fig. 5 The ten VOCs with the highest fiber affinity (% Area) in the different treatments: *Nodulisporium* sp. GS4d2IIIa at 3 days (*Nod3*), and 5 days (*Nod5*), in the intraspecific (*Nod-Nod*) and interspecific interactions with *P. aphanidermatum* (*Nod-Pyt*)

to the treatment. In particular, monoterpenes were produced in high proportion by *Nod-Nod* and *Nod-Pyt* treatments; on the other hand, the sesquiterpenes relative abundance was similar in all other treatments. Thus, the difference between treatments was in accordance to the larger or lesser production of the diverse chemical family groups, aside from mono and sesquiterpenes, found in different relative abundance (% area). For example, alkynes production by *Nod5* that were absent in *Nod3*. *Nod3* is characterized by high production of esters and other compounds families, and *Nod5* by high production of esters and unknown

compounds. Amines, monoterpenes, and sesquiterpenes production was constant between *Nod3* and *Nod5*. The difference is given by the relative abundance of alkanes, alkenes, alcohols, benzene derivatives, alkynes (absent in *Nod3*); unknown metabolites, and other compounds. On the other hand, monoterpenes and alkenes production was constant in intra and interspecific interactions. The difference between these two treatments was the chemical families produced in different proportion: alkanes, alkynes, amines, alcohols and benzene derivatives, besides the absent ketones in *Nod-Pyt*.

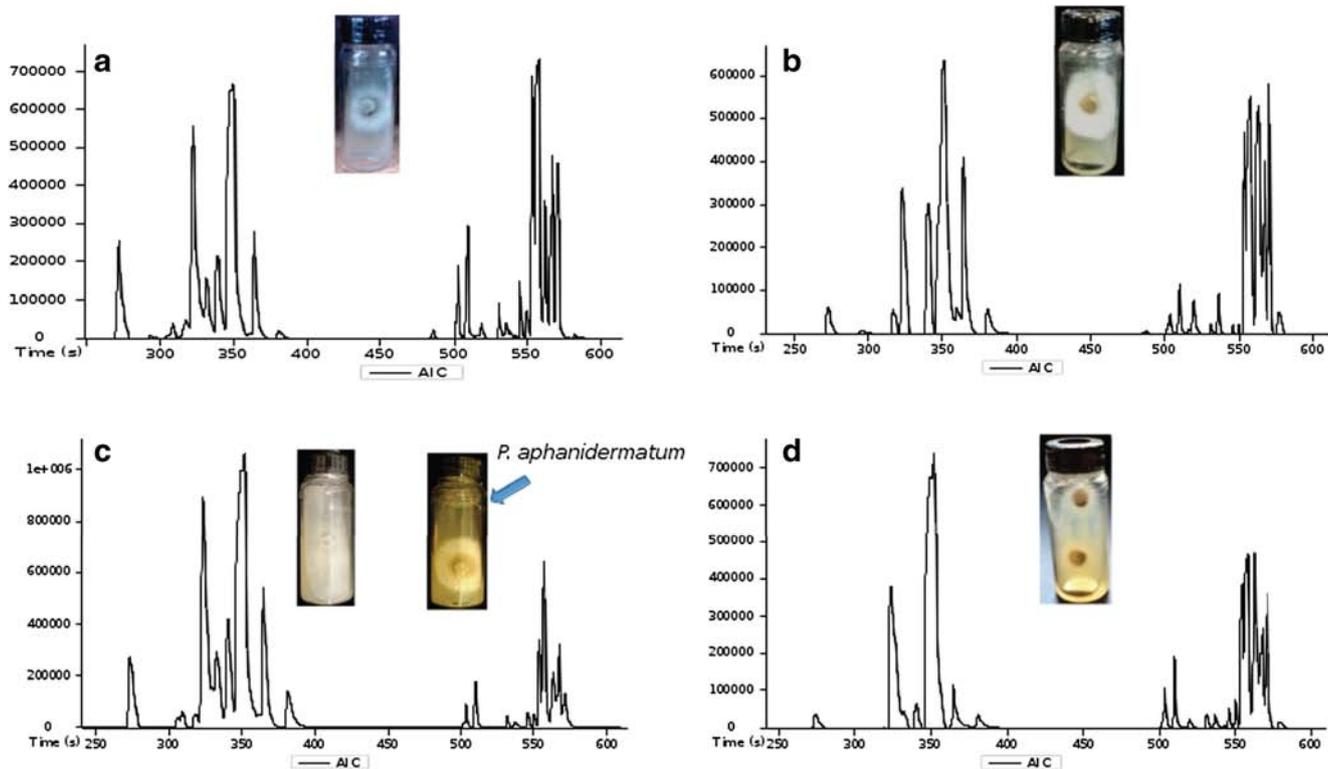


Fig. 6 Representative chromatograms of the four treatments. **a** *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a grown for 3 days in PDA at 28 °C (*Nod3*). **b** *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a grown for 5 days in PDA at

28 °C (*Nod5*). **c** Interspecific interaction between *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and *P. aphanidermatum* (*Nod-Pyt*). **d** Intraspecific interaction (*Nod-Nod*)

Figure 9 shows the MCA analysis based on the total volatile composition detailed in Table 3. It is evident the clear separation or metabolic trends between the four treatments, and the different chemical composition in each time and kind of interaction. Each ellipse encloses the metabolites that are exclusively produced by each treatment at the expense of the metabolites on the opposite extreme of the plot. *Nod3* individual profile is closer to *Nod-Pyt* profile; thus, indicating they

share common metabolic trends, and they are distant from *Nod5* and *Nod-Nod* meaning that there are differences in the volatile production. Metabolites projected near the origin are produced by all treatments (18 compounds) and they do not characterize any volatile profile, they are constitutively produced. Metabolites outside ellipses are produced by two or three of the near treatments on the plot in different amounts, and are not representative of any treatment.

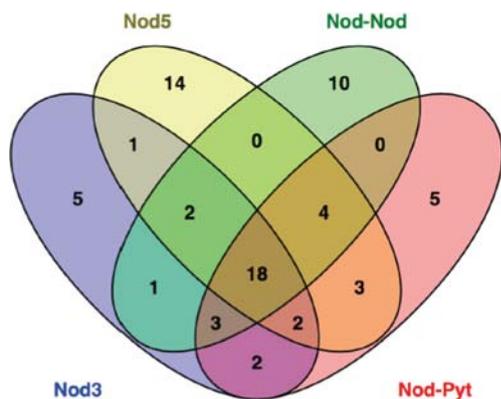


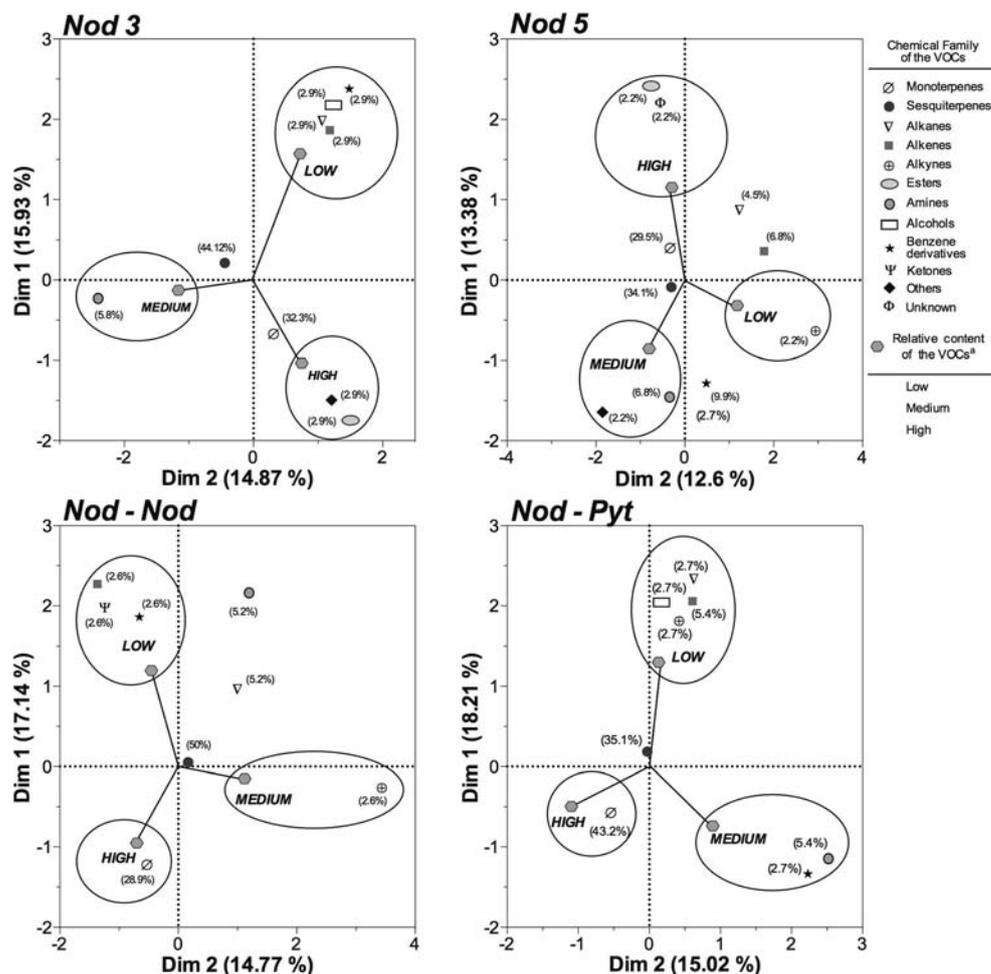
Fig. 7 Venn diagram showing the volatile metabolites shared between treatments. *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a at 3 days (*Nod3*), *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a at 5 days (*Nod5*), intraspecific interaction (*Nod-Nod*), and interspecific interaction with *P. aphanidermatum* (*Nod-Pyt*)

VOCs in *Nod3* and *Nod5* Treatments

Thirty four VOCs were detected in *Nod3* samples, and these compounds were mainly terpenes—mono and sesquiterpenes—(Figs. 4 and 8). The compound with the highest fiber affinity was eucalyptol (33.22 %), followed by a caryophyllene-like compound (ID 55, 10.98 %), and *m*-cymene (9.77 %) (Fig. 5). In addition, 44 VOCs were detected in the *Nod5* treatment (Table 3), and these VOCs were also mainly mono and sesquiterpenes (Figs. 4 and 8). The compounds with the highest fiber affinity were limonene (9.85 %), eucalyptol (6.92 %), and *o*-cymene (6.86 %) (Fig. 5). From the total VOCs produced, the two treatments shared 23; 5 were exclusively produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a grown for 3 days and 14 compounds, when grown during 5 days (Figs. 7 and 9).

Fig. 8 Multiple correspondence analysis (MCA) of the association between diversity of the VOCs belonging to the principal chemical families and the relative content of these compounds for each experimental condition.

^aRelative content was based on the 33.3 and 66.7 % percentile distribution of the compounds for each treatment: low, < 33.3 %; medium, 33.3–66.7 %; and high, > 66.7 % according to the total area. *Nod3* (<0.38, 0.38–1.69 and >1.69), *Nod5* (<0.75, 0.75–2.27, and >2.27), *Nod-Pyt* (<0.49, 0.49–1.87, and >1.87), and *Nod-Nod* (<0.82, 0.82–2.68 and >2.68). Arbitrary ellipses have been drawn to assist interpretation on the association of each relative content and the chemical families associated to these categories. Note the association between high relative content and monoterpenes in the antagonistic interactions *Nod-Nod* and *Nod-Pyt* and the constant production of sesquiterpenes in all treatments. Percentages (%) next to the chemical family symbol represent the relative amount of each chemical family



VOCs in Intraspecific Antagonistic Interaction *Nod-Nod*

Nodulisporium sp. GS4d2IIIa VOCs also changed in the antagonistic interaction with another inoculum of *Nodulisporium* sp. GS4d2IIIa. Under this condition, 38 VOCs (mainly monoterpenes and sesquiterpenes) were produced, but 9 compounds were specific to this interaction (Figs. 4, 7 and 9). The compounds with the highest fiber affinity were limonene (13.16 %), eucalyptol (12.83 %), and γ -terpinene (7.70 %) (Fig. 5). On the other hand, from the total identified VOCs, 24 were also found in the 3-day *Nodulisporium* sp. GS4d2IIIa growth; and, 24 compounds in the 5-day growth (Figs. 7 and 9).

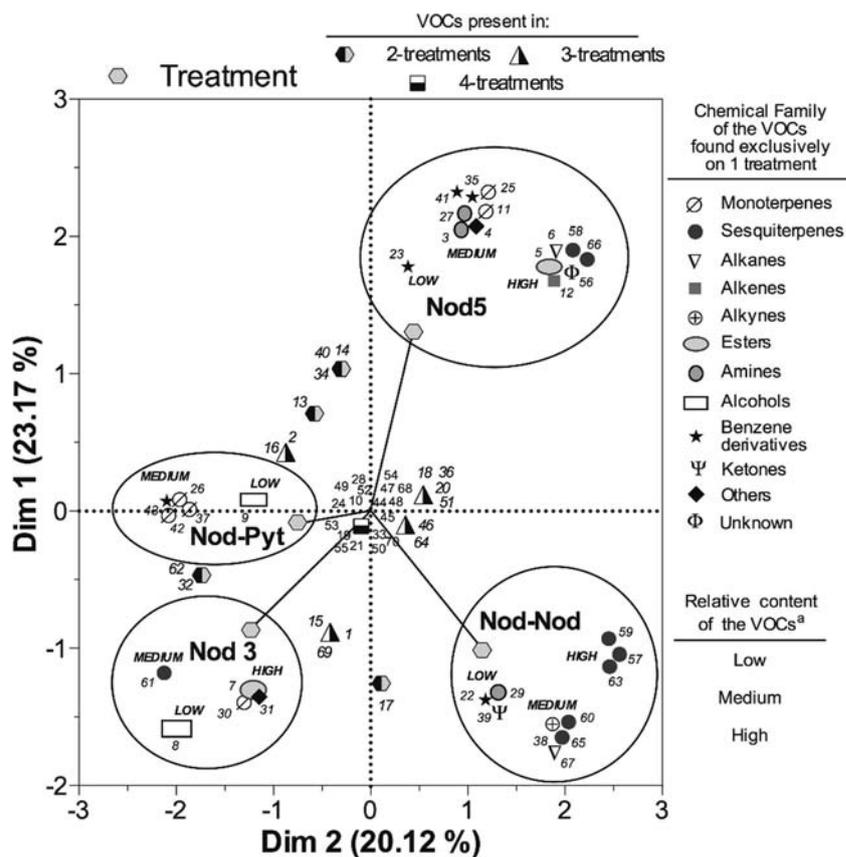
VOCs in Interspecific Antagonistic Interaction *Nod-Pyt*

We analyzed the VOCs production in the interaction between *Nodulisporium* sp. GS4d2IIIa and *P. aphanidermatum*, because *P. aphanidermatum* was the most affected microorganism in the multiple antagonism bioassays.

VOCs profile differed in the interspecific interaction and exhibited antifungal properties because they inhibited

P. aphanidermatum growth completely in the SPME vial. In this antagonistic interaction, 37 compounds were identified mainly as mono and sesquiterpenes (Figs. 4 and 8). The compounds with the highest fiber affinity were eucalyptol (22.58 %), limonene (13.66 %), and *o*-cymene (10.77 %) (Fig. 5). From these VOCs, five, compounds were identified only in the antagonistic interspecific interaction (Figs. 7 and 9), and belonged to *Nodulisporium* sp. GS4d2IIIa, since *P. aphanidermatum* did not produce volatile compounds and this has not been reported previously. The compounds produced exclusively from the interspecific interaction were 2-methyl-1-butanol, 4-carene, two unidentified monoterpenes (ID 37 and 42) and 3,5-dimethylanisole. In addition, from the total compounds produced, 25 were also found in VOCs identified during 3 days *Nodulisporium* sp. GS4d2IIIa vial cultures, and 27 during 5 days vials cultures (Figs. 7 and 9). On the other hand, 24 out of the 37 detected compounds were also found in the antagonistic interaction between two *Nodulisporium* sp. inocula. From the total VOCs detected, only 18 were present in all treatments, but in different proportion. These metabolites were: thujene, 2-pentylfuran, α -phellandrene, α -terpinene, eucalyptol, limonene, γ -terpinene,

Fig. 9 Multiple correspondence analysis (MCA) of the VOCs profile obtained during each experimental condition. Each number corresponds to the compounds presented in Table 3. ^aRelative content was based on the 33.3 and 66.7 % percentile distribution of the compounds for each treatment: low, < 33.3 %; medium, 33.3–66.7 %; and high, > 66.7 % according to the total area. Arbitrary ellipses have been drawn to assist interpretation of the differential volatile profile of each treatment. Note the clear separation between time of growth and kind of antagonistic interaction



α -terpinolen, an unidentified sesquiterpene (ID 47), β -caryophyllene, β -elemene, isocaryophyllene, α -humullene, 4-methylene-2,8,8-trimethyl-2-vinyl-bicyclo[5.2.0]nonane; 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-bicyclo[5.3.0]decane, a caryophyllene like compound (ID 55), 2,4a,5,6,9a-hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1*H*)benzocycloheptene and β -selinene (Figs. 7 and 9).

Discussion

Nodulisporium sp. GS4d2II1a inhibited the growth of oomycetes and fungi by replacing their mycelia, partially or completely, and killed four oomycetes. The mechanisms that probably mediate these antagonistic interactions are mycoparasitism, predation or hyphal interference [6, 7, 10]. Further studies should attempt to demonstrate which is the principal mechanism when these fungi and oomycetes mycelia interact.

On the other hand, after 2 to 6 days of antagonistic interaction between *Nod3* or *Nod5* and the plant pathogens in the multiple antagonism bioassay, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a suppressed the pathogens at distance, which indicated the production of VOCs with antifungal properties as an antagonistic mechanism. Therefore, we made antagonism bioassays in divided plates to verify if this was the only mechanism involved,

since the production of antifungal diffusible metabolites could be present. Additionally, *Nod5* also was self-inhibited probably due to the high VOCs concentration in the plates; or, also due to production of defense metabolites by the plant pathogens (dual antagonism) [10].

Bioactive VOCs production was demonstrated in divided Petri dish bioassays; however, this inhibition was lower and on fewer microorganisms than that observed in the simple and multiple direct antagonism bioassays. Moreover, the dichloromethane extract from *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a culture did not inhibit plant pathogens growth; so, secondary metabolites have no significant inhibitory activity in these culture and extraction conditions. These results indicated that the inhibitory effect at distance, observed in multiple antagonisms, is likely due to a synergistic effect between metabolites diffusible through the culture medium, and VOCs produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Also, the antifungal activity could result from the volatiles mixture activity and not just from the activity of one compound. It is known that VOCs act synergistically to produce the biological activity and lose it when they act alone [9, 38, 39]. On the other hand, the VOCs production could increase or change in multiple direct antagonistic interactions (interspecific interaction); thus, we detected the VOCs produced in four treatments (*Nod3*, *Nod5*, *Nod-Nod*, and *Nod-Pyt*) to verify this hypothesis.

Like other species of *Hypoxylon* and *Nodulisporium*, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a produced a mixture of volatile secondary metabolites when cultured in vitro. They were detected in the four treatments. MCA showed that volatile metabolites changed depending on the fungus age, which is in agreement with the biological activity observed in the multiple antagonism bioassays. They also changed in the antagonistic interaction. This was more evident in Fig. 9, where four different profiles were formed. In addition, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a produced 18 compounds constitutively and its production did not depend on the fungus age, inoculum size or whether it was interacting or not with *P. aphanidermatum*.

The volatiles specific to the intraspecific antagonistic interaction *Nod-Nod* could serve as a signal for recognition of another *Nodulisporium* sp. colony. Also, the inoculum size could affect the outcome of the interaction by changing the VOCs produced. The VOCs production only during interspecific antagonistic interaction *Nod-Pyt*—showed that the pathogen presence induced production of other metabolites that were not synthesized in other treatments (de novo biosynthesis), while other were suppressed. De novo biosynthesis of these metabolites could be achieved through activation of genes that were suppressed in cultures of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a and activated by biotic stress; that is, the presence of *P. aphanidermatum* [40]. Induction of terpenes synthesis has been reported through terpenes synthases activation in the mixed fermentations of *Fusarium* spp. with fungi or bacteria [13, 40, 41]. In this study, three out of the five compounds, exclusively produced in the interspecific interaction, were monoterpenes, and these five compounds could have antifungal properties that inhibit competitors, as demonstrated in studies about co-cultivation of microorganisms for the induction of antimicrobial secondary metabolites [40]. In addition, the change in VOCs profile should be determined when *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a is interacting with other plant pathogenic fungi or oomycetes, as in the multiple antagonism bioassays, because the profile might change depending on the competitors; and, therefore, their biological activity. In addition, the VOCs produced in the interaction could act against other plant pathogens. Thus, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a likely produce VOCs as a defense mechanism against fungal competitors inside the host plant, but also as host defensive responses against plant pathogens and competitors [31].

The qualitative and quantitative changes in the VOCs profile, during the time of the fungal growth and in antagonistic interaction, were reported previously in wood rotting basidiomycetes [12, 14]. In the study conducted by Hynes et al. [14], it was observed that, although there was no long distance inhibition between the basidiomycetes *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*, VOCs production was detected in both fungi, which changed during the interaction time. In the case of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a, we observed that VOCs were a distance defense mechanism in the

antagonistic interactions. However, they also could be present in antagonistic interactions where no long distance inhibition was observed.

According to these results, further studies should be carried out in order to better understand the ecological functions of the secondary metabolites produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a by making in vivo test in the host plant *G. sepium* to test if *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a can protect the plants of pathogen attacks by direct inhibition, or by VOCs production. In addition, further studies in crop protection might be needed, since the products described in this work can be useful for biological control against fungal and oomycetes plant pathogens (mycofumigation); either by using an inoculum or more of *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a; or through the interspecific interaction (*Nod-Pyt*) for the inhibition; or growth control of plant pathogens in postharvest treatments; or directly in crops. Likewise, the chemical composition of the extracts should be studied.

Ecological Function and Biological Activity of Identified VOCs

Terpenes (myrcene, eucalyptol, caryophyllene, terpinene, among others) produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a are essential oils components of medicinal plants and frequently produced by fungi [1, 3, 38].

Terpenes are also ecologically significant. They play important roles in communication among plants, plant–insects, and plant–pathogen interactions. Mono and sesquiterpenes have in some cases antifungal activity, which could constitute an antagonistic mechanism during fungal interactions [12, 42]. Sesquiterpenes are useful for invertebrates to communicate among them, and to localize plant or animal hosts; also, by plants and fungi to attract insects for propagule dispersal, and for defense against pathogens. In addition, they are used for plant growth promotion and as antifungal agents [3, 4, 14, 42].

Some of the compounds produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a were previously identified from other sources. Compounds like eucalyptol, β -caryophyllene, β -elemene, γ -gurjunene, and 3-methyl-1-butanol were also produced by the endophytic *Nodulisporium* sp., isolated from *Myroxylon balsamum*; and, its VOCs had antifungal activity against plant pathogens [17]. The compounds limonene, eucalyptol, γ -terpinene, β -ocimene, 3-methyl-1-butanol, 4-carene, δ -guaiene and 1,2,4-tris(methylene)-cyclohexane were identified in the endophyte *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34, isolated from *Lagerstroemia loudoni*. This fungus has potential as biocontrol agent for postharvest diseases of citrus fruits caused by *Penicillium expansum* and *Penicillium digitatum*, and against plant pathogenic fungi [19]. Other endophytic *Nodulisporium* spp., isolated from *Thelypteris angustifolia* [18], and *Persea indica* [16], produce 1,2,4-tris(methylene)-cyclohexane and eucalyptol; and, the endophyte isolated from

Cassia fistula [20], also produces eucalyptol. Their VOCs inhibit plant pathogenic fungi and oomycetes. On the other hand, the remaining detected compounds have not been reported previously for the *Nodulisporium* species.

In addition, the biological functions of several of the individual VOCs identified from *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a were previously reported. For example, the monoterpene eucalyptol or 1,8-cineol is a constituent of essential oils of many medicinal and aromatic plants, with antimicrobial [43] and antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* [44], *Aspergillus niger* [45], and *Sclerotinia sclerotiorum*. Furthermore, a fuel potential has been ascribed to this compound [20]. In addition, β -caryophyllene is produced by *F. oxysporum* MSA 35 [42] and *Talaromyces wortmannii* [3, 46]. This sesquiterpene could enhance plant growth and induce tolerance or resistance to the fungal pathogens *Colletotrichum higginsianum* and *Botrytis cinerea*. *Streptomyces globisporus* JK-1 produces β -caryophyllene that inhibits the mycelial growth, conidial germination, and sporulation of *Penicillium italicum* [47]. Also, endophytes such as *Muscodor yucatanensis* [31], *Phoma* sp. [48], and the ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains MAJ and NAU [49] produce β -caryophyllene. Additionally, the monoterpene limonene is an antifungal compound that inhibits mycelial growth and aflatoxin B1 production of *A. flavus* [50]. Limonene also suppresses mycelial growth, conidial germination, and sporulation of *P. italicum* [47]. Thus, eucalyptol, β -caryophyllene, and limonene, some of the compounds found with high fiber affinity, are compounds with antifungal activity that might give the bioactivity to the VOCs mixture produced by *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a. Finally, 2-methyl-1-butanol and 4-carene, volatile compounds produced exclusively in the interspecific interaction, were also detected in endophytes producers of antifungal VOCs [19, 31, 47].

In summary, *Nodulisporium* sp. GS4d2II1a inhibited growth, or killed plant pathogens, by emitting VOCs, producing diffusible metabolites; and, by hyphal interactions that act in conjunction. These VOCs change qualitatively and quantitatively after 3 and 5 days of endophyte culture, and in the intraspecific and interspecific interaction with *P. aphanidermatum*. Finally, volatile compounds could be used as biological control of plant pathogenic fungi and oomycetes.

Acknowledgments This work was supported by the CONACyT grant 179194. Rosa E. Sánchez-Fernández is a doctoral student from the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Química, UNAM. She was recipient of a doctoral fellowship from CONACyT, Mexico. We wish to thank to M. Sc. Allan Espinosa Gómez from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, for his help with the molecular identification; to PhD. Bertha Tlapal Bolaños and PhD. Olga Gómez from Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de Mexico, for the plant pathogens donation used in the bioassays; to Gonzalo Roque Flores, Instituto de Química, UNAM, for his support with the images edition; to M. Sc. Rebeca Martínez from Instituto de Biología, UNAM, for her support with the brightfield photomicrographs; to M. Sc. Ernesto L. Guevara from Facultad de Medicina, UNAM, for his support

in the article revision and especially to M. Sc. Rafael Ibarra Contreras from Facultad de Química, UNAM, for language revision.

References

- Morath SU, Hung R, Bennett JW (2012) Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol Rev* 26:73–83. doi:10.1016/j.fbr.2012.07.001
- Yu H, Zhang L, Li L et al (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* 165:437–49. doi:10.1016/j.micres.2009.11.009
- Zhi-Lin Y, Yi-Cun C, Bai-Ge X, Chu-Long Z (2012) Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Crit Rev Biotechnol* 32:363–73. doi:10.3109/07388551.2011.651429
- Effmert U, Kalderás J, Warnke R, Piechulla B (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol* 38:665–703. doi:10.1007/s10886-012-0135-5
- Spraker JE, Jewell K, Roze LV et al (2014) A volatile relationship: profiling an inter-kingdom dialogue between two plant pathogens, *Ralstonia solanacearum* and *Aspergillus flavus*. *J Chem Ecol* 40: 502–513. doi:10.1007/s10886-014-0432-2
- Gams W, Diederich P, Pöldmaa K (2004) *Fungicolous Fungi*. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier, Burlington, MA, pp 343–392
- Gao F, Dai C, Liu X (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African J Microbiol Res* 4: 1346–1351
- Stinson M, Ezra D, Hess WM et al (2003) An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Sci* 165:913–922. doi:10.1016/S0168-9452(03)00299-1
- Strobel G (2011) *Muscodor* species—endophytes with biological promise. *Phytochem Rev* 10:165–172. doi:10.1007/s11101-010-9163-3
- Boddy L (2000) Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol Ecol* 31:185–194. doi:10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683.x
- Rotheray TD, Chancellor M, Jones TH, Boddy L (2011) Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes. *Fungal Ecol* 4:42–55. doi: 10.1016/j.funeco.2010.09.001
- Evans J, Eyre C, Rogers HJ et al (2008) Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecol* 1:57–68. doi:10.1016/j.funeco.2008.06.001
- Minerdi D, Bossi S, Gullino ML, Garibaldi A (2009) Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. *Environ Microbiol* 11:844–854. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01805.x
- Hynes J, Müller CT, Jones TH, Boddy L (2007) Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J Chem Ecol* 33:43–57. doi:10.1007/s10886-006-9209-6
- Park M-S, Ahn J-Y, Choi G-J et al (2010) Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of post-harvest diseases of apple. *Plant Pathol J* 26:253–259. doi:10.5423/PPJ.2010.26.3.253
- Tomscheck AR, Strobel G, Booth E et al (2010) *Hypoxyylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microb Ecol* 60:903–14. doi:10.1007/s00248-010-9759-6

17. Mends MT, Yu E, Strobel GA et al (2012) An endophytic *Nodulisporium* sp. producing volatile organic compounds having bioactivity and fuel potential. *J Pet Environ Biotechnol* 03:117. doi:10.4172/2157-7463.1000117
18. Riyaz-Ul-Hassan S, Strobel G, Geary B, Sears J (2013) An endophytic *Nodulisporium* sp. from Central America producing volatile organic compounds with both biological and fuel potential. *J Microbiol Biotechnol* 23:29–35
19. Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B et al (2013) Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Prot* 45:63–70. doi:10.1016/j.cropro.2012.11.015
20. Nigg J, Strobel G, Knighton WB et al (2014) Functionalized para-substituted benzenes as 1,8-cineole production modulators in an endophytic *Nodulisporium* species. *Microbiology* 160:1772–1782. doi:10.1099/mic.0.079756-0
21. Rodrigues KF (1994) The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* 86:376. doi:10.2307/3760568
22. Ellis MB (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England
23. Ju Y-M, Rogers JD (1996) A revision of the genus *Hypoxyylon*. APS, St. Paul, MI
24. Kornerup A, Wanscher JH (1967) Methuen handbook of colour, 3rd edn. Methuen E, London
25. Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118. doi:10.1111/J.1365-294x.1993.Tb00005.X
26. Larena I, Salazar O, González V et al (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *J Biotechnol* 75:187–194. doi:10.1016/S0168-1656(99)00154-6
27. Akins RA, Lambowitz AM (1985) General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. *Mol Cell Biol* 5:2272–2278. doi:10.1128/MCB.5.9.2272
28. Martin KJ, Rygiel PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol*. doi:10.1186/1471-2180-5-28
29. Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
30. Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Jiménez-Estrada M et al (2008) Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* 69:1185–1196. doi:10.1016/j.phytochem.2007.12.006
31. Macías-Rubalcava ML, Hernández-bautista BE, Oropeza F et al (2010) Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscador yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J Chem Ecol* 36:1122–1131. doi:10.1007/s10886-010-9848-5
32. Meléndez-González C, Muriá-González MJ, Anaya AL et al (2015) Acremoxanthone E, a novel member of heterodimeric polyketides with a bicyclo[3.2.2]nonene ring, produced by *Acremonium camptosporum* W. GAMS (Clavicipitaceae) endophytic fungus. *Chem Biodivers* 12:133–147
33. Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4th edition, 4th ed. *Biochem Syst Ecol*. doi:10.1016/0305-1978(96)83708-2
34. Oliveros JC (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. In: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
35. Costa PS, Santos NC, Cunha P, et al. (2013) The use of Multiple Correspondence Analysis to explore associations between categories of qualitative variables in healthy ageing. *J Aging Res* 1–12. doi: 10.1155/2013/302163
36. Semmar N (2013) Two computational simplex approaches to graphical highlighting metabolic phenotypes and their functional origins: Correspondence Analysis and Weighted Metabolic Profiles Analysis. *Metabolomics coming age with its Technol. Divers.*, 1st ed. Elsevier, pp 441–492
37. Kuhnert E, Fournier J, Peřoh D et al (2014) New *Hypoxyylon* species from Martinique and new evidence on the molecular phylogeny of *Hypoxyylon* based on ITS rDNA and β -tubulin data. *Fungal Divers* 64:181–203. doi:10.1007/s13225-013-0264-3
38. Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S et al (2010) Phytomedicine synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Integr Med* 17:1061–1066. doi:10.1016/j.jphymed.2010.06.018
39. Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147:2943–2950. doi:10.1099/00221287-147-11-2943
40. Bertrand S, Bohni N, Schnee S et al (2014) Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol Adv* 32:1180–1204. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.001
41. Müller MEH, Steier I, Köppen R et al (2012) Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. *J Appl Microbiol* 113:874–887. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05388.x
42. Minerdi D, Bossi S, Maffei ME et al (2011) *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS Microbiol Ecol* 76:342–351. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01051.x
43. Nikolić B, Mitić-Čulafić D, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J (2011) Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food Chem Toxicol* 49:2035–45. doi:10.1016/j.fct.2011.05.015
44. Vilela GR, de Almeida GS, D'Arce MABR et al (2009) Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *J Stored Prod Res* 45:108–111. doi:10.1016/j.jspr.2008.10.006
45. Stojković D, Soković M, Glamočlija J et al (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chem* 128:1017–1022. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.007
46. Yamagiwa Y, Inagaki Y, Ichinose Y et al (2011) *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J Gen Plant Pathol* 77:336–341. doi:10.1007/s10327-011-0340-z
47. Li Q, Ning P, Zheng L et al (2010) Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biol Technol* 58:157–165. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.06.003
48. Strobel G, Singh SK, Riyaz-Ul-Hassan S et al (2011) An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiol Lett* 320:87–94. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02297.x
49. Müller A, Faubert P, Hagen M et al (2013) Volatile profiles of fungichemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genet Biol* 54:25–33. doi:10.1016/j.fgb.2013.02.005
50. Singh P, Shukla R, Prakash B et al (2010) Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem Toxicol* 48:1734–1740. doi:10.1016/j.fct.2010.04.001

HONGOS ENDÓFITOS: FUENTE POTENCIAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS CON UTILIDAD EN AGRICULTURA Y MEDICINA

Rosa Elvira Sánchez-Fernández, Brenda Lorena Sánchez-Ortiz,
Yunueth Karina Monserrat Sandoval-Espinosa,
Álvaro Ulloa-Benítez, Beatriz Armendáriz-Guillén,
Marbella Claudia García-Méndez y Martha Lydia Macías-Rubalcava*

¹Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: *mamaciasr@gmail.com; mlmacias@unam.mx

RESUMEN

Los hongos endófitos habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. La estrecha relación que existe entre el endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos. Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina. En este trabajo se describen diferentes aspectos relacionados con los hongos endófitos, abarcando su definición, descubrimiento, clasificación, interacción con su hospedera, papel ecológico, ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos, así como estrategias metodológicas para su obtención. Por último, se presentan algunos resultados recientes, de estudios realizados en nuestro grupo de trabajo mostrando que los hongos endófitos son una fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos.

Palabras Clave: Actividad antimicrobiana, actividad fitotóxica, compuestos bioactivos, hongo endófito, interacción hongo-planta, metabolito secundario.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live inside plant tissues without causing disease symptoms. In most cases, their relationship with the host plant is considered beneficial because the endophyte is able to produce bioactive metabolites that the host can use as defense mechanisms, and this allows survival of both organisms. Recent studies have demonstrated that the endophytic fungus confers protection to the host plant against attack by pathogens and herbivores. Since they have the ability to benefit the host plant, it is reasonable to think that the diverse bioactive compounds produced by the endophyte might exhibit potential applications in agriculture and medicine, and also serve as a source of inspiration for the discovery of new and more active molecules. In this paper, some aspects regarding endophytic fungi are described: definition, discovery, classification, interactions with their host plants, ecological role, selected examples of bioactive metabolites, host selection strategy, and methodological strategies for their isolation. Finally, we show some recent results of our research, which demonstrate that endophytic fungi are promising sources of new bioactive secondary metabolites.

Key Words: Antimicrobial activity, phytotoxic activity, bioactive compounds, endophytic fungus, fungus-plant interaction, secondary metabolite.

INTRODUCCIÓN

La palabra ‘endófito’ etimológicamente significa ‘dentro de la planta’ (*endon*: dentro, *phyton*: planta). En un principio, el término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas, pero fue Wilson en 1995¹ quien restringió el término únicamente a microorganismos, refiriéndose sólo a bacterias y a hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedera. Actualmente, este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos²⁻⁵, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos⁶.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. El ‘endofitismo’ se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, definida por localización (no por función), y que se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera²⁻⁶. Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. De todos los ecosistemas del Planeta Tierra, los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y éstas parecen albergar también una cantidad significativa de hongos endófitos^{7,8}.

DESCUBRIMIENTO E HISTORIA DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

El término ‘endófito’ lo propuso de Bary en 1866⁹ y los primeros registros de la presencia de hongos endófitos provienen del año 1898, en donde los investigadores formularon la hipótesis de que los cuadros toxicológicos observados en animales, se debían al consumo de semillas o partes aéreas de los pastos *Lolium temulentum*, *L. arvense*, *L. linicolum* y *L. remotum* (Poaceae) infectados con hongos Clavicipitáceos (familia del ergot)¹⁰. Sin embargo, no se dio continuidad a esta suposición hasta que Bacon en 1977, relacionó la presencia del hongo *Neotyphodium coenophialum* a la alta incidencia de una intoxicación del ganado denominada “síndrome de verano”, debida al consumo de pastos de la especie *Festuca arundinaceae* (Poaceae). En los años 80, Funk describió la resistencia al ataque de insectos en los pastos infectados con endófitos¹¹ y en 1988, Clay¹² propuso que varios hongos endófitos Clavicipitáceos son mutualistas que defienden a la hospedera del ataque de herbívoros. Posteriormente, varios investigadores de múltiples disciplinas como químicos, ecólogos, botánicos y micólogos se han dedicado al estudio de estos organismos⁸.

En la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado enormemente debido a que son productores de metabolitos secundarios novedosos y con diversa actividad biológica.

CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endófitos son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenecen al *phylum* Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota¹³.

Históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida^{3,6,14,15}. Rodríguez y colaboradores² (2009) los clasifican tomando en cuenta su taxonomía, sus plantas hospederas, su evolución y sus funciones ecológicas. En esta clasificación se conservan los grupos Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, y este último se divide en tres clases (Cuadro I).

Los Clavicipitáceos son los endófitos que colonizan los pastos, mientras que los no Clavicipitáceos colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas^{2,8}. Existen diversos estudios relativos a los hongos endófitos de las zonas templadas, no obstante, la información sobre los endófitos de zonas tropicales aún representa un objeto potencial de estudio, ya que se tiene información muy limitada al respecto^{2,8}. Asimismo, se conoce relativamente poco de la naturaleza de la interacción entre las plantas leñosas y sus endófitos foliares, a pesar de su abundancia y gran diversidad, particularmente en regiones tropicales, donde se ha planteado que cada hoja representa un mosaico de diversas especies de hongos endófitos^{2,14}. Dreyfuss y colaboradores¹⁶ estimaron que debe haber aproximadamente 1.3 millones de especies de hongos endófitos por descubrir.

RELACIÓN HONGO ENDÓFITO-PLANTA HOSPEDERA

La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis^{2,4,5}. En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. El hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas³. En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad^{3,6}.

PAPEL ECOLÓGICO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endófitos usualmente toman nutrientes y protección de su hospedera y algunos de ellos en retribución

Criterio	Clavicipitáceos		No Clavicipitáceos	
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
Colonización <i>in planta</i>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión*	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros

*Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de las semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.

Cuadro I. Grupos y clases de hongos endófitos.

pueden desempeñar un papel mutualista, ya que pueden beneficiarla al inducir su crecimiento, al aumentar su tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos^{2,4,5,17}.

Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno en particular o a otros hongos endófitos. Sin embargo, puede no inhibir a otros organismos de su mismo entorno¹⁵. Algunos hongos endófitos inducen los efectos alelopáticos de su hospedera a través de la producción de metabolitos secundarios o aleloquímicos, es decir, influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes^{4,5}. Incluso se ha visto que ciertos hongos endófitos producen los precursores o los metabolitos secundarios con actividad biológica, cuya síntesis se le había atribuido a la planta^{4,18,19}. Esto se ha observado principalmente en las interacciones entre los hongos endófitos y los pastos, sin embargo, en plantas leñosas (árboles o arbustos) se ha comprobado en escasas ocasiones^{3,14,18}.

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su hospedera contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), por medio de tres mecanismos:

- 1) Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.
- 2) Indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.
- 3) Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación^{14,17}.

Un ejemplo de mecanismo de defensa directo contra los patógenos de la hospedera es la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) del hongo endófito *Muscodor yucatanensis*, aislado de *Bursera simaruba* (Burseraceae). Los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio de *M. yucatanensis* y, principalmente, la mezcla de VOCs que produce, son letales para los fitopatógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Algunos de los VOCs identificados son: octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno, derivados del naftaleno, entre otros^{20,21}.

El segundo mecanismo de protección a las hospederas es evidenciado en la investigación realizada por Waller y colaboradores (2005)²², en donde demostraron que la resistencia en la cebada (*Hordeum vulgare*, Poaceae) al ataque de microorganismos patógenos es debida a la colonización de las raíces por el endófito *Piriformospora indica*. En las plantas

inoculadas con el endófito e infectadas con los patógenos *Fusarium culmorum* KF 350 y *Cochliobolus sativus* fue menor la pérdida de la biomasa y la severidad de la enfermedad causada por estos microorganismos. Los efectos positivos observados están relacionados con la inducción de niveles más altos del antioxidante ascorbato, presente en las raíces y mediado por acción del endófito *P. indica*. Este antioxidante puede proteger a la hospedera de la muerte celular^{22,23}.

El último mecanismo de protección está bien ilustrado con una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum*, denominada Fo47, la cual inhibe al patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y reduce los síntomas de la pudrición de la raíz en el tomate (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae). La inoculación en plantas de tomate de una carga de esporas 50 veces mayor que la del patógeno, asegura que las esporas de *F. oxysporum* Fo47 compitan con *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* por la misma fuente de carbono, lo que reduce la disponibilidad de nutrientes para este último microorganismo. Estas cepas de *Fusarium* presentan estrategias similares de colonización. En consecuencia, *F. oxysporum* Fo47 puede ocupar y reducir el número de sitios adecuados para la fijación de esporas y la colonización del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, por lo que resulta en un menor número de lesiones sintomáticas²⁴.

Los mecanismos de protección hacia las hospederas pueden actuar de manera simultánea bajo diversas condiciones de estrés²³.

Los hongos endófitos, además de interactuar con su hospedera, interactúan entre ellos dentro de la planta. Estas interacciones interespecíficas (entre distintas especies de hongos) están regidas por: a) mecanismos físicos o directos, como son las interacciones entre hifas, la interferencia hifal (micoparasitismo) y el contacto de micelio, y b) mecanismos químicos o indirectos, los cuales se dan por la producción de compuestos solubles, algunos metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas o por compuestos volátiles efectivos a distancia que limitan el crecimiento de las hifas del competidor^{14,15,18,25-28}. Estos mecanismos han sido evidenciados en algunas interacciones en cultivos *in vitro* donde los hongos antagonistas producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas o muestran una clara interferencia. En la actualidad, son escasos los estudios que establecen cuál es el modo de acción y cuáles son los compuestos antimicrobianos implicados en las interacciones interespecíficas dentro de las comunidades fúngicas en la naturaleza^{25,29-32}. Por lo tanto, el estudio químico y biológico de estas interacciones conduce al descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente diversos y novedosos, por lo que este recurso constituye una fuente prometedora de moléculas potencialmente útiles para su uso en la agricultura, la medicina y la industria. Además, mediante estos estudios es posible seleccionar especies útiles como agentes de control biológico^{4,5,21,31,32}.

METABOLITOS SECUNDARIOS DERIVADOS DE HONGOS ENDÓFITOS Y SU APLICACIÓN EN AGROQUÍMICA Y FARMACIA

Los metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos poseen una gran diversidad química y algunos de ellos presentan esqueletos base no reportados en otras fuentes naturales. Así por ejemplo, los alcaloides lolina y sus derivados, que comprenden una familia de compuestos pirrolizidínicos, presentan un núcleo base de 2-oxa-6-azatriciclo[4.2.1.0^{3,7}] nonano; los indoloditerpénicos tipo lolitrem, que consisten en sistemas heterocíclicos de 8 anillos fusionados; los indoloditerpénicos paspalitrem, de 7 anillos y los alcaloides del ergot tipo ergoclavina y ergopeptina constituyen metabolitos secundarios biológicamente activos, exclusivos de hongos endófitos Clavicipitáceos^{3-6,19,33}.

También se han encontrado muchos compuestos novedosos que presentan núcleos heterocíclicos complejos, producidos por hongos de diferentes ambientes, como los alcaloides espiroquinazolínicos, los alcaloides isoindólicos fusionados con un macrociclo como son las quetoglobosinas y las citocalasinas. Además, se han aislado diversos anhidropéptidos pirazodiónicos, ciclopéptidos y lipociclopéptidos con actividad biológica^{3-6,19,33}.

En la literatura se encuentra reportado un número considerable de compuestos de origen policétido, incluyendo aquéllos que se encuentran ampliamente distribuidos en todos los taxones de hongos, como los que han sido aislados exclusivamente de hongos endófitos. Muchos consisten en macrólidos, así como en diversos compuestos aromáticos como bencenos, naftalenos, antracenos, piranos, furanos, benzofuranos, cromanos, xantanos, oxepanos y dépsidos^{3-6,19,33}.

Los hongos endófitos también producen metabolitos secundarios con estructuras terpénicas novedosas y exclusivas. Los chokoles A-K son compuestos que presentan un esqueleto monoterpénico de ciclofarnesano. El guanacastano tiene un esqueleto base tricíclico de los compuestos denominados guanacastepenos, ambos compuestos son exclusivos de hongos endófitos. Del mismo modo, se han aislado compuestos con estructuras comunes, pero reportadas únicamente en endófitos, por ejemplo tricotecenos, eudesmanos, calamenos, fusiococanos y diterpenos tipo sordarina. Los esteroides que más se han reportado son los de esqueleto de ergostano^{3-6,19,33}.

Asociada a la diversidad estructural de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos, sobreviene su pluralidad funcional y su aplicación^{3-6,19,34}. Un claro ejemplo de la importancia de estos compuestos como fuente potencial de fármacos está representado por el taxol, un diterpeno aislado del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*, Taxaceae)³³, que se utiliza en el tratamiento de cáncer de ovario y de mama, además de otras aplicaciones en enfermedades proliferativas de los tejidos⁴. Su elevado costo

lo hace disponible sólo a ciertos sectores de la población³⁵. A principios de los años 90, Stierle y colaboradores (1993)³⁶ sugirieron que los tejidos vegetales de *T. brevifolia* podrían albergar microorganismos endófitos que sintetizaran taxol. Posteriormente, Strobel y colaboradores (1993)³⁷ aislaron de esta especie vegetal el hongo endófito *Taxomyces andreanae* que tiene la capacidad de sintetizar taxol. En estudios posteriores, se encontraron otras especies de microorganismos aislados de coníferas capaces de producir taxol, como *Pestalotiopsis microspora*^{38,39}, *Periconia* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp.⁴⁰⁻⁴²

Por otro lado, debido a la compleja interacción que se establece entre los hongos endófitos y su planta hospedera, entre distintas especies de hongos endófitos, y otras especies invasoras como otros hongos, oomicetos y bacterias, se ha puesto atención no sólo en el papel ecológico que pueden desempeñar los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos en dichas interacciones, sino en las aplicaciones de estos compuestos para el desarrollo de agroquímicos como nematocidas, fungicidas, insecticidas y herbicidas^{4,6}. Así por ejemplo, el estudio biodirigido del extracto orgánico del hongo endófito *Phomopsis phaseoli*, aislado de un árbol tropical no identificado que crece en la Guyana Francesa, permitió el aislamiento del ácido 3-hidroxi- β -ionónico, un compuesto con actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita*⁴³.

Por otra parte se aislaron dos policétidos de la familia de los dépsidos, la uredinina A y el 4-[(2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoil)oxi]-2-hidroxi-3,6-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetilfenilo, del hongo *Cladosporium uredinicola*, un endófito de la guayaba (*Psidium guajava*, Rosaceae). Ambos dépsidos presentan actividad herbicida inhibiendo el flujo de electrones del agua al metilviológeno, actuando como inhibidores de la reacción de Hill en tilacoides de espinaca⁴⁴.

Edenia gomezpompae, un endófito de las hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae), produce varios compuestos con potencial antifúngico, incluyendo las preusomerinas EG₁, EG₂ y EG₃ y las palmarumicinas CP₂, CP₁₇ y CP₁₈. Las preusomerinas inhiben significativamente el crecimiento de varios endófitos de su misma planta hospedera, así como el de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica, como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp, *A. solani*, *P. capsici* y *P. parasitica*^{25,45,46}.

La investigación sobre endófitos de pastos han demostrado que pueden defender a su hospedera del ataque de herbívoros por medio de compuestos con actividad insecticida y antialimentaria. Existen estudios que han demostrado que los alcaloides tipo lolina son efectivos contra los áfidos *Rhopalosiphum padi*⁴⁷, los heterópteros *Oncopeltus fasciatus*⁴⁸, el coleóptero *Popillia japonica*⁴⁹ y el lepidóptero *Spodoptera*

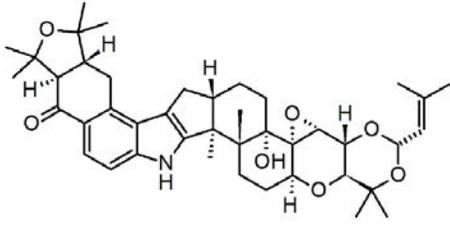
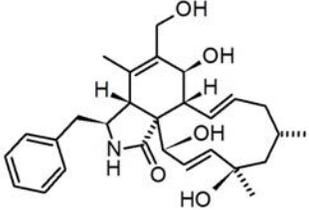
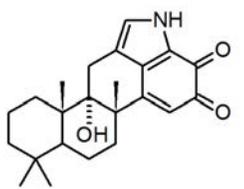
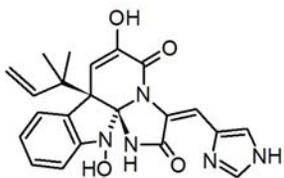
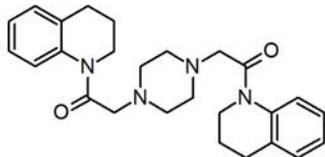
*frugiperda*⁵⁰. Debido a su baja toxicidad en los mamíferos, se están desarrollando métodos sintéticos para su venta como insecticidas comerciales⁵¹.

Diversos compuestos aislados de hongos endófitos presentan actividad antibacteriana, contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y micobacterias. Por citar un ejemplo, en el estudio realizado por Zhao y colaboradores (2012)⁵², se reportaron dos compuestos con esa actividad, obtenidos del endófito *Gliomastix murorum* Ppf8, aislado de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Trilliaceae): un esteroide ergosta-5,7,22-trien-3-ol y un benzofurano el 2,3-dihidro-5-hidroxi- α,α -dimetil-2-benzofuranometanol. Ambos compuestos presentaron valores de CI₅₀ entre 55.65 a 145.36 μ g/mL contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus haemolyticus*⁵². Por otra parte, en un estudio realizado por Rukachaisirikul en 2008⁵³, se reportó una amida novedosa, la fomoenamida, que presenta actividad antifúngica contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra. Este compuesto se obtuvo del endófito *Phomopsis longicolla* aislado a partir del árbol *Garcinia dulcis* (Clusiaceae).

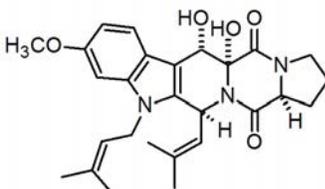
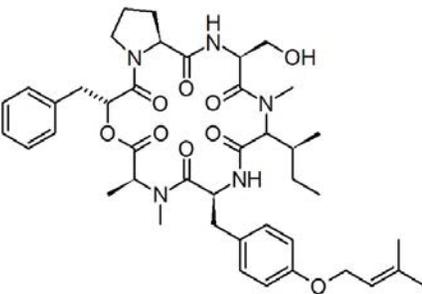
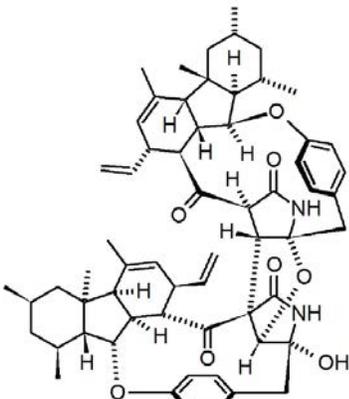
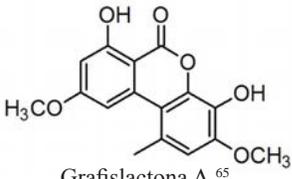
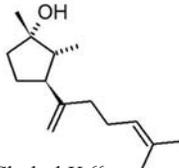
Cabe destacar que los estudios sobre hongos endófitos también aportan conocimientos sobre metabolitos secundarios aislados de hongos de diferentes fuentes, reportados con funciones biológicas distintas. Para citar un ejemplo, la fumigaclavina C es un alcaloide tipo clavina que fue originalmente aislado y reportado por Cole y colaboradores en 1977⁵⁴ como una micotoxina alimentaria de *Aspergillus fumigatus*. Posteriormente, Pinheiro y colaboradores en 2012⁵⁵ reportaron la actividad antimicrobiana de este compuesto, obtenido a partir del extracto acetofílico de una especie endófito no identificada de *Aspergillus* aislado de la planta medicinal *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). La fumigaclavina C es activo contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*.

En el Cuadro II se presentan ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

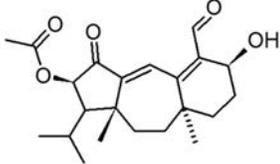
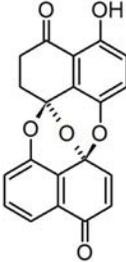
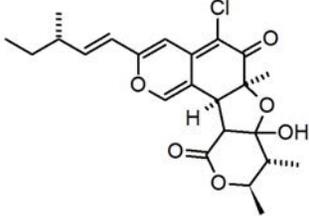
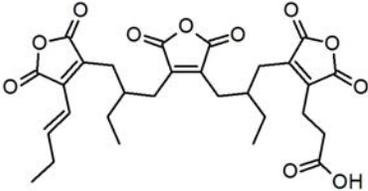
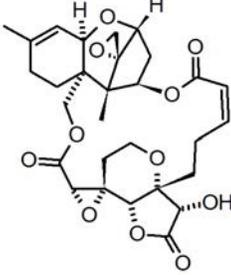
Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sinnúmero de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco o un agroquímico potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos⁵⁶. De la misma forma, se ha propuesto que estos metabolitos podrían ser utilizados para desarrollar agroquímicos de origen natural, que serían menos perjudiciales para el hombre y para el medio ambiente que los compuestos químicos sintéticos que actualmente se utilizan en la agricultura, ya que los productos naturales pueden interactuar con blancos moleculares específicos, afectar procesos fisiológicos particulares y presentar menores índices de bioacumulación⁴.

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p><i>Neotyphodium lolii</i> (Clavicipitaceae). Endófito de <i>Lolium perenne</i> (Poaceae).</p>	 <p>Lolitrem B⁵⁷ Alcaloide indolterpénico.</p>	<p>Neurotóxico. Inhibidor de los canales de calcio activados por potasio.</p>
<p><i>Endothia gyrosa</i> IFB-E023 (Cryphonectriaceae). Endófito de <i>Vatica mangachapo</i> (Dipterocarpaceae).</p>	 <p>Citocalasina Z10⁵⁸ Alcaloide policétido isoindólico.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de leucemia K562.</p>
<p><i>Mycoleptodiscus</i> sp. (Magnaporthaceae). Endófito de <i>Desmotes incomparabilis</i> (Rutaceae).</p>	 <p>Micoleptodiscina B⁵⁹ Alcaloide indolterpénico.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de fibroblastos humanos IMR-90.</p>
<p><i>Penicillium</i> sp. (Trichocomaceae). Endófito de <i>Mauritia flexuosa</i> (Arecaceae).</p>	 <p>Glandicolina B⁶⁰ Alcaloide α-carbolínic.</p>	<p>Antimicrobiano. Contra <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Micrococcus luteus</i> y <i>E. coli</i>.</p>
<p><i>Aspergillus niger</i> IFB-E003 (Trichocomaceae). Endófito de <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae).</p>	 <p>Aspernigerina⁶¹ Alcaloide piperazínico.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de los carcinomas nasofaríngeo epidermoide, cervical Hela y colorectal SW1116.</p>

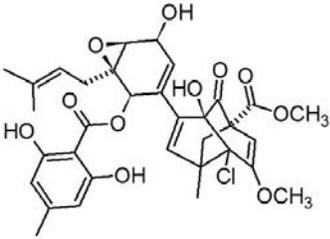
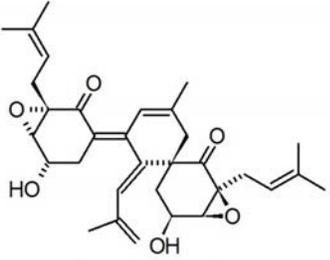
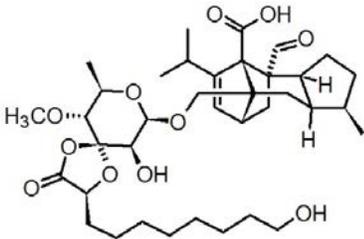
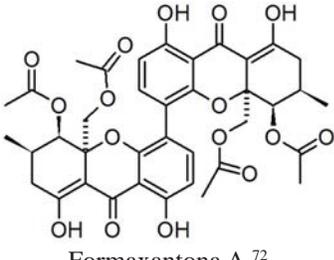
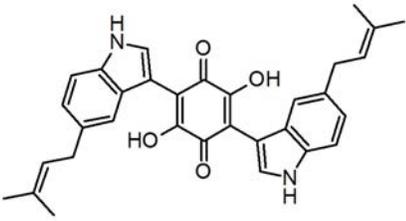
Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p><i>Aspergillus tamarii</i> (Trichocomaceae). Endófito de <i>Ficus carica</i> (Moraceae).</p>	 <p>Fumitremorgina B.⁶² Alcaloide indolil dicitopiperazínico.</p>	<p>Antifúngico. Activo contra los fitopatógenos <i>Fusarium graminearum</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Phytophthora capsici</i>, <i>Phytophthora oryzae</i>.</p>
<p><i>Pullularia</i> sp. BCC 8613 (Dothioraceae). Endófito de <i>Calophyllum</i> sp. (Calophyllaceae).</p>	 <p>Pulularina A.⁶³ Depsipéptido.</p>	<p>Antiplasmodico. Contra <i>Plasmodium falciparum</i> K1. Antiviral. Contra el virus del herpes simple (HSV-1).</p>
<p><i>Neonectria ramulariae</i> Wollenw KS-246 (Nectriaceae). Endófito de un árbol no identificado.</p>	 <p>Bispirrocina.⁶⁴ Alcaloide dímero de la pirrocina.</p>	<p>Inhibidor enzimático. Actúa sobre la prolilpolipeptidasa.</p>
<p><i>Cephalosporium</i> sp. IFB-E001 (Incertae sedis). Endófito de <i>Trachelospermum jasminoides</i> (Apocynaceae).</p>	 <p>Grafislactona A.⁶⁵ Benzocromeno policétido.</p>	<p>Antioxidante. Inhibe la peroxidación del ácido linoleico.</p>
<p><i>Epichloë festucae</i> (Clavicipitaceae). Endófito de varias especies de pastos (Poaceae).</p>	 <p>Chokol K.⁶⁶ Sesquiterpeno (2,6-ciclofarnesano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p>	<p>Atractor de insectos. Atractor de la mosca <i>Botanophila</i> para la propagación de esporas.</p>

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p>Hongo CR115 no identificado. Endófito de <i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae).</p>	 <p>Guanacastepeno.⁶⁷ Diterpeno (guanacastano, esqueleto reportado sólo en endófitos).</p>	<p>Antibacterial. Contra <i>S. aureus</i> y <i>Enterococcus faecium</i>.</p>
<p><i>E. gomezpompae</i> (Pleosporaceae). Endófito de <i>C. acuminata</i> (Verbenaceae).</p>	 <p>Preusomerina EG₁.²⁵ Bisnaphthoespirocetal.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>P. capsici</i>, <i>P. parasitica</i>, <i>F. oxysporum</i> y <i>A. solani</i>.</p>
<p><i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae).</p>	 <p>Quetomugilina D.⁶⁸ Isocromano policétido.</p>	<p>Antifúngico. Activo contra <i>Mucor miehei</i>. Tóxico para <i>Artemia salina</i>.</p>
<p><i>Dwyaangam colodena</i> (Orbiliaceae). Endófito de <i>Picea rubens</i> (Pinaceae).</p>	 <p>Cordianhídrido B.⁶⁹ Anhídrido derivado de ácidos grasos.</p>	<p>Insecticida. Contra el lepidóptero <i>Choristoneura fumiferana</i>.</p>
<p><i>Myrothecium roridum</i> IFB-E091 (incertae sedis). Endófito de raíces de <i>Artemisia annua</i> (Asteraceae).</p>	 <p>Roritoxina E.⁶⁰ Macrólido tipo tricoteceno.</p>	<p>Citotóxico. En líneas celulares de carcinoma gástrico SGC-7901 y hepatocarcinoma SMMC-7721.</p>

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<p><i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.</p>	 <p>Cloropupukeananina.⁷⁰ Dímero policétido prenilado.</p>	<p>Antiviral. Inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1).</p>
<p><i>Pestalotiopsis fici</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de un árbol no identificado colectado en Hangzhou, República Popular China.</p>	 <p>Pestalofona C.⁴² Dímero policétido prenilado.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>Candida albicans</i>, <i>Geotrichum</i> <i>candidum</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>.</p>
<p><i>Morinia logiappendiculata</i> (Amphisphaeriaceae). Endófito de <i>Santolina rosmarinifolia</i> (Asteraceae), <i>Helichrysum stoechas</i> (Asteraceae), <i>Thymus mastichina</i> (Lamiaceae) y <i>Calluna vulgarisin</i> (Ericaceae).</p>	 <p>Moriniafungina.⁷¹ Diterpeno tipo sordiarina.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>Cryptococcus neoformans</i>, <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. krusei</i> y <i>C. lusitaniae</i>.</p>
<p><i>Phoma</i> sp. (Incertae sedis). Endófito de <i>Costus</i> sp. (Costaceae).</p>	 <p>Formaxantona A.⁷² Dímero de xantona policétida.</p>	<p>Antifúngico. Contra <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Pyricularia oryzae</i> y <i>Ustilago violacea</i>.</p>
<p><i>Chaetomium</i> sp. (Chaetomiaceae). Endófito de <i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae).</p>	 <p>Coeliodinol.⁵⁶ Alcaloide indólico.</p>	<p>Citotóxico. Contra líneas celulares de linfoma murino t L5178Y.</p>

Cuadro II. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos (continuación).

ESTRATEGIAS DE SELECCIÓN DE HOSPEDERAS ÚTILES PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

Los antecedentes y consideraciones anteriores, aunados a la gran diversidad de especies vegetales existentes a nivel mundial, así como a la capacidad que tienen algunos hongos endófitos de mejorar los mecanismos de resistencia de su hospedera y de protegerla del ataque de posibles enemigos, han permitido establecer estrategias de selección de plantas hospederas que incrementen la posibilidad de aislar hongos endófitos capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos. Estos criterios incluyen^{4,73}:

1. Plantas sin síntomas de enfermedad que crecen rodeadas de otras plantas infectadas por diversos patógenos o atacadas por herbívoros (criterio ecológico), las cuales pueden estar colonizadas por endófitos productores de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas e insecticidas.
2. Plantas que crecen en áreas de alta biodiversidad y que, por lo tanto, pueden alojar endófitos igualmente biodiversos.
3. Plantas que tienen antecedentes etnobotánicos, que se relacionan con algún uso específico o aplicaciones relacionadas a los intereses de la investigación, como son las plantas con uso en la medicina tradicional (criterio etnomédico).
4. Plantas con estrategias especiales para su supervivencia o que crecen en ambientes únicos.
5. Plantas endémicas que poseen una longevidad inusual, o que han ocupado extensiones de tierra poco convencionales.

ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIOACTIVOS

Para el descubrimiento de metabolitos secundarios de microorganismos endófitos, se ha aplicado en repetidas ocasiones la estrategia metodológica que se indica a continuación: en primer lugar, se realiza la selección de las hospederas, de acuerdo con los criterios mencionados y se lleva a cabo el aislamiento de los hongos endófitos^{34,73,75,76}. La caracterización taxonómica de los endófitos puros se lleva a cabo mediante el análisis detallado de sus características macro y microscópicas, así como mediante el empleo de técnicas moleculares modernas⁷⁷. A continuación se realiza la preselección de los microorganismos, mediante un criterio ecológico, principalmente con base en las interacciones planta-microorganismo^{4,17,78} y microorganismo-microorganismo^{21,25,79,80}. En múltiples ocasiones, la observación de este tipo de interacciones ha constituido un punto de partida para la preselección de especies fúngicas como una fuente valiosa de principios bioactivos^{21,25,81}.

En segundo lugar, es necesario realizar cultivos en pequeña escala, con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos fúngicos objeto de estudio.

Posteriormente, se preparan los extractos del medio de cultivo y del micelio^{21,25}. A continuación, se realizan pruebas biológicas preliminares, las cuales consisten en la determinación del efecto biológico de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio, mediante la utilización de bioensayos sencillos y de fácil implementación. Entre los más utilizados para detectar posibles agroquímicos se encuentran los ensayos de germinación y de crecimiento radicular de diversas especies de semillas^{21,25,82} y el ensayo para detectar inhibidores y promotores del crecimiento de plantas, mediante el empleo de *Lemna minor* (Araceae)⁸³. La determinación del potencial antifúngico se realiza mediante la medición del efecto de los extractos sobre el crecimiento de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica^{21,25}, mientras que para evidenciar el efecto insecticida y nematicida se utilizan bioensayos sobre diferentes artrópodos y nematodos para observar actividad tóxica, ovicida, y/o repelente⁸⁴.

Por otra parte, para encontrar metabolitos secundarios con aplicación terapéutica, existen ensayos para evidenciar actividad antimicrobiana, empleando métodos comunes como el de difusión en disco, el de dilución en agar y la prueba de inhibición sobre el crecimiento radial de microorganismos patógenos para los humanos^{21,25,85-87}. Sobre diferentes líneas celulares tumorales, para comprobar acción anticancerígena⁸⁸. Para comprobar actividad antiinflamatoria se realizan pruebas sobre diferentes líneas celulares y la prueba de enema en oreja de ratón⁸⁹. Para demostrar actividad antidiabética se trabaja con ratones^{90,91} y, por último, mediante la infección de células por virus y el método de difusión en pozo con una suspensión de células virales, se logra observar la actividad antiviral⁹². Cabe destacar que estas pruebas son sólo una muestra representativa de los principales bioensayos utilizados y de la actividad biológica puesta en evidencia.

Estas evaluaciones preliminares permiten detectar extractos naturales apropiados para la obtención de agentes terapéuticos o agroquímicos^{4,5}. En general, los extractos que demuestran respuestas positivas en los ensayos de fitoinhibición o como inhibidores del crecimiento de microorganismos, se consideran candidatos adecuados para la realización de otras pruebas biológicas dirigidas a un blanco de acción específico en la fisiología o en el metabolismo vegetal o de los microorganismos, respectivamente^{17,44}.

Una vez seleccionados los extractos activos se aíslan los principios bioactivos mediante estudios químicos biodirigidos. Este proceso permite la obtención de los metabolitos secundarios con actividad biológica^{21,25,72}. Los compuestos naturales activos puros se identifican y, por último, éstos son sometidos a ensayos biológicos adicionales con la finalidad de explorar de manera más detallada su posible aplicación como fármacos o agroquímicos comerciales^{13,25,44,74}. En el caso particular de los agroquímicos potenciales, se realizan

pruebas de invernadero sobre especies vegetales cultivables o sobre malezas para determinar la actividad de tipo pre y postemergente⁸⁷.

Finalmente, es necesario determinar la toxicidad de los compuestos bioactivos y para ello se han desarrollado pruebas preliminares sobre los crustáceos *Artemia salina* y *Daphnia magna*^{93,94}, así como la muerte celular de macrófagos, utilizando líneas celulares⁹⁵. Posteriormente, es necesario verificar la toxicidad en mamíferos, en cuyo caso se trabaja inicialmente con ratones y cobayos, para posteriormente dar inicio a las pruebas clínicas en pacientes y personas sanas^{96,97}.

En este contexto, se muestran a continuación los resultados obtenidos a nivel de extractos orgánicos de hongos endófitos con potencial antagonístico, aislados de las hojas de plantas seleccionadas bajo un criterio ecológico, y colectadas en una zona de alta biodiversidad como lo es la 'Reserva Ecológica de la Biósfera Sierra de Huautla' (REBIOSH), ubicada en Morelos, México. Esta investigación se realiza actualmente en nuestro grupo de trabajo y está enfocada principalmente en la obtención de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antimicrobiano con posible aplicación sobre el control de malezas, hongos verdaderos y oomicetos fitopatógenos.

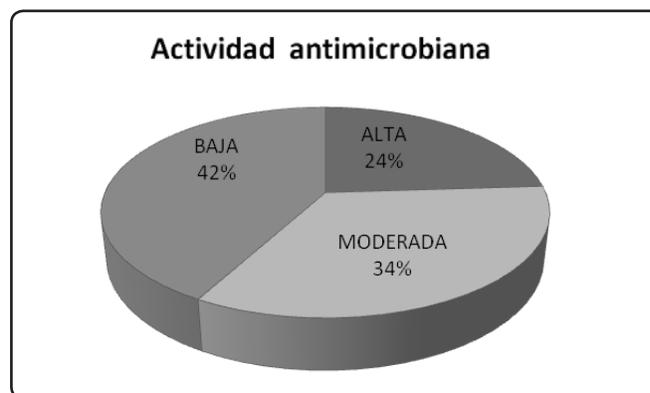
Para lograr este objetivo, se aislaron hongos endófitos^{73,76} de las hojas sanas de 11 plantas pertenecientes a las familias Burseraceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae y Piperaceae, obteniendo un total de 4310 aislamientos de hongos endófitos, de los cuales se han conseguido 183 morfotipos puros a la fecha, que poseen potencial antagonístico sobre el crecimiento de otras poblaciones de hongos endófitos que emergían al mismo tiempo durante las etapas de aislamiento y purificación. Estos resultados muestran claramente que las plantas en estudio se encuentran colonizadas por un amplio número de hongos endófitos, y confirman que el criterio de selección empleado, es decir, plantas que crecen en áreas de gran diversidad biológica y que no presentan ningún daño por patógenos o herbívoros, constituyen una buena estrategia para aislar una gran cantidad y diversidad de endófitos^{4,74}.

Con el propósito de obtener los metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos y comprobar que poseen potencial antimicrobiano y fitotóxico, de los 183 endófitos puros, se eligieron 75 para su cultivo, los cuales inhibieron significativamente el crecimiento de otros endófitos en las interacciones antagonísticas observadas durante la etapa de purificación. Los hongos seleccionados se cultivaron en pequeña escala bajo diferentes condiciones, utilizando como medio de crecimiento, caldo papa dextrosa (1 L), incubando en condiciones estáticas y en agitación (15 días a 200 rpm), en medios sólidos empleando agar papa dextrosa (10 cajas de Petri de 10 cm) y en medio a base de arroz (300 g), incubado

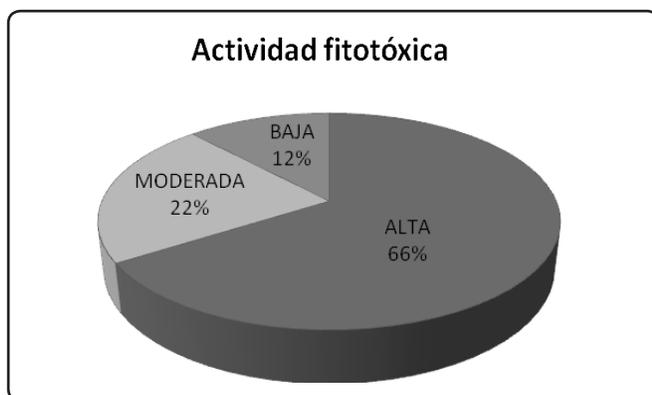
estáticamente por un periodo de 30 días, con fotoperiodo de luz artificial-obscuridad 12:12 h, a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, se obtuvieron los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio para los cultivos en medio líquido y de medio-micelio para los cultivos en medio sólido y arroz. El potencial antimicrobiano y fitotóxico, de los extractos orgánicos obtenidos se determinó cuantitativamente sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y sobre la longitud de la raíz de plantas modelo, utilizando el método de dilución en agar^{21,25,98,99}.

De los de 75 endófitos cultivados en pequeña escala, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos con los mayores rendimientos. En la Gráfica 1 se muestra el potencial antimicrobiano de 36 extractos orgánicos sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica, dos hongos verdaderos (*Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*) y sobre tres oomicetos (*Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*). El efecto de inhibición provocado por cada uno de los extractos fúngicos evaluados sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba, se agrupan en alto, moderado y bajo, según su actividad antimicrobiana mostrada, donde bajo corresponde a inhibiciones del 1-24%, moderado del 25-50% y alto del 51-100%, de acuerdo con los intervalos establecidos en nuestro grupo de trabajo. El 42% tuvo actividad baja, el 34% presentó actividad moderada y el 24% exhibió actividad alta.

Estos resultados demuestran que los metabolitos secundarios biosintetizados por más del 50% de los hongos endófitos evaluados, poseen actividad antimicrobiana de moderada a alta. Por lo que son considerados como candidatos idóneos en la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural, con actividad antimicrobiana, útiles en la agricultura moderna y que además posiblemente tengan un papel en la protección de su hospedera contra patógenos y herbívoros.



Gráfica 1. Potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de hongos endófitos sobre el crecimiento de cinco microorganismos fitopatógenos con importancia económica.



Gráfica 2. Potencial fitotóxico de los extractos orgánicos de hongos endófitos sobre la longitud de la raíz de dos plantas de prueba.

Con respecto a la actividad fitotóxica en la Gráfica 2 se muestra el efecto inhibitorio de 70 extractos orgánicos sobre la longitud de la raíz de las semillas de dos plantas modelo, *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Solanum lycopersicum* (Solanaceae). De nueva cuenta, el porcentaje de inhibición provocado por cada uno de los extractos orgánicos evaluados sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba se agrupan en alto, moderado y bajo, según su actividad fitotóxica mostrada, donde bajo corresponde a inhibiciones del 1-24%, moderado del 25-50% y alto del 51-100%, de acuerdo con los intervalos establecidos en nuestro grupo de trabajo. El 12% de los extractos evaluados tuvo actividad fitotóxica baja, el 22% presentó actividad moderada y el 60% mostró actividad alta. Estos datos demuestran que la mayoría de los hongos endófitos aislados de plantas de la REBIOSH son excelentes productores de compuestos con actividad fitotóxica, útiles para el desarrollo de agentes herbicidas alternativos a los usados hoy en día. Por otra parte, es posible que estos compuestos también contribuyan en la defensa de su planta hospedera, protegiéndola de la invasión de algunas plantas o malezas que habitan en su comunidad y a su vez pueden ser necesarios para su sobrevivencia dentro de su planta hospedera.

En el presente trabajo se pone en evidencia que los hongos endófitos representan candidatos idóneos, para la investigación y obtención de compuestos bioactivos.

CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento de los hongos endófitos como productores de metabolitos secundarios tóxicos contra herbívoros, comenzó un amplio estudio que agrupa a investigadores de diversas áreas con el fin de conocer varios aspectos de los endófitos, entre ellos la producción de metabolitos bioactivos útiles para la humanidad.

Con los ejemplos proporcionados podemos demostrar la importancia del estudio de los hongos endófitos y su potencial para la obtención de compuestos bioactivos. Sin embargo, falta todavía mucha investigación que nos proporcione información sobre la toxicidad y seguridad de los metabolitos secundarios para que puedan ser utilizados como agentes agroquímicos o como fármacos. Asimismo, es necesario realizar estudios sobre el papel que estos metabolitos puedan tener en la naturaleza y en la protección hacia su hospedera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través del Instituto de Química, por el apoyo para la realización de los estudios sobre hongos endófitos de plantas de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto 81017.

REFERENCIAS

- Wilson, D. Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**, 274-276 (1995).
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E. & Redman, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New. Phytol.* **182**, 314-330 (2009).
- Schulz, B. & Boyle, C. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **109**, 661-686 (2005).
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257-268 (2004).
- Tan, R.X. & Zou, W.X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 448-459 (2001).
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem. & Biol.* **19**, 792-798 (2012).
- Mittermeier, R.A., Meyers, N. Robles-Gil, P. & Mittermeier, C.G. in Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions (ed. CEMEX, México, 1999).
- Arnold, E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* **21**, 51-66 (2007).
- de Bary, A. in Morphologie und physiologie der pilze, flechten, und myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany (Leipzig, Germany, Engelmann, 1866).
- Guerin, M.P. Structure particuliere du fruit de quelques graminees. *Bot.* **12**, 365-374 (1898).
- Funk, C.R., Halisky, P.M., Ahmad, S. & Hurley, R.H. in How endophytes modify turfgrass performance and response to insect pests in turfgrass breeding and evaluation trials (ed. Lemaire, E.) 137-145 (Avignon, France 1985).
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**, 10-16 (1988).
- Rosa, L.H. *et al.* in Drug Development. A case study based insight into modern strategies (ed. Rundfeldt, C.) 1-18 (Intech, Croatia, 2011).
- Herre, E.A. *et al.* Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* **88**, 550-558 (2007).

15. Arnold, A.E. *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* **100**, 15649-15654 (2003).
16. Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. in *The discovery of natural products with therapeutic potential* (ed. Gullo, V.P.) 49-80 (Butterworth-Heinemann, London, UK, 1994).
17. Gao, F.K., Dai, C.C. & Liu, X.Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4(13)**, 1346-1351 (2010).
18. Herre, E.A. *et al.* In *Biotic interactions in the tropics: Their role in the maintenance of species diversity*. (ed. Burslem, D.F.R.P., Pinard, M.A. & Hartey, S.E.) 226-227 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2005).
19. Zhao, J. *et al.* in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 567-576 (ed. Méndez-Vilas, A., 2010).
20. González, M.C. *et al.* *Muscodyrucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. *Mycotaxon* **110 (1)**, 363-372 (2009).
21. Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodyrucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.* **36**, 1122-1131 (2010).
22. Waller, F. *et al.* The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* **102**, 13386-13391 (2005).
23. Kageyama, S.A., Mandyam, K.G. & Jumpponen, A. in *mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. (ed. Varma, A.) 29-57 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2008).
24. Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 710-721 (2005).
25. Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochem.* **69**, 1185-1196 (2008).
26. Body, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microb. Ecol.* **31(3)**, 185-194 (2000).
27. Tuininga, A.R. in: *The Fungal Community: It's organization and role in the ecosystem* (ed. Dighton, J., White, J. & Oudemans, J.) 265-283 (CRC Press, E.U., 2005).
28. Widden, P. in *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. (ed. Wicklow, D. T. & Sönderström, B.) 135-147 (Springer-Verlang, Alemania, 1997).
29. Rotheray, T.D., Chancellor, M., Jones, T.H. & Boddy, L. Grazing by collembola affects the outcome of interspecific mycelial interactions of cord-forming basidiomycetes. *Fungal Ecol.* **4(1)**, 42-55 (2011).
30. Hynes, J., Müller, C.T., Jones, T.H. & Boddy, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholomafasciculare* and *Resinicium bicolor*. *J. Chem. Ecol.* **33**, 43-57 (2007).
31. Yuen, T.K., Hyde, K.D. & Hodgkiss, I.J. Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microb. Ecol.* **37**, 257-262 (1999).
32. Shearer, C.A. Fungal competition. *Can. J. of Bot.* **73 (S1)**, 1259-1264 (1995).
33. Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P. & McPhail, A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93(9)**, 2325-2327 (1971).
34. Gunatilaka, A.A.L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* **69**, 509-526 (2006).
35. Nicolaou, K.C. Total synthesis of taxol. *Nature* **367**, 630-634 (1994).
36. Stierle, A., Strobel, G.A. & Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science* **260**, 214-216 (1993).
37. Strobel, G.A., Stierle, A., Stierle, D. & Hess, W.M. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with pacific yew. *Mycotaxon* **47**, 71-78(1993).
38. Stribel, G. *et al.* Taxol from *Pestalotiopsis microspore*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiol.* **142**, 435-440(1996).
39. Li, J.Y. *et al.* Endophytic taxol producing fungi from bald cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology* **142**, 2223-2226 (1996).
40. Kim, S.U., Strobel, G.A. & Ford, E. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Agr. Chem. Biotechnol.* **42**, 97-99 (1999).
41. Sun, D.F., Ran, X.Q. & Wang, J.F. Isolation and identification of Taxol producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiol.* **48**, 589-595(2008).
42. Liu, L., Liu, S., Chen, X., Guo, L. & Che, Y. Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* **17(2)**, 606-613 (2009).
43. Schwarz, M. *et al.* 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle endophytic fungi. *Phytochem.* **65**, 2239-2245 (2004).
44. Medeiros, L.S. *et al.* Evaluation of herbicidal potential of depsides from *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus found in *Guava* fruit. *J. Braz. Chem. Soc.* **23(8)**, 1551-1557 (2012).
45. González, M.C. *et al.* A new endophytic ascomycete from El Eden Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Mycotaxon.* **101**, 251-260 (2007).
46. Meléndez González, C. Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2008) 113 págs.
47. Siegel, D.A. *et al.* Meridional variations of springtime phytoplankton community in the Sargasso Sea. *J. Mar. Res.* **48**, 379-412 (1990).
48. Yates, S.G., Fenster, J.C. & Bartelt, R.J. Assay Of tall Fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large milkweed bug. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 354-357 (1989).
49. Patterson, C.G., Potter, D.A. & Fannin, F.F. Feeding deterrence of alkaloids from endophyte- infected grasses to Japanese beetle grubs. *Entomol. Exp. Appl.* **61**, 285-289 (1991).
50. Riedel, W.E., Kieckhefer, R.E., Petroski, R.J. & Powell, R.G. Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behavior modification and toxicity. *J. Entomol. Sci.* **26(1)**, 122-129 (1991).
51. Hovey, M.T., Eklund, E.J., Pike, R.D., Mainkar, A.A. & Scheerer, J.R. Synthesis of (±)-acetylornoroline via stereoselective

- tethered aminohydroxylation. *Org. Lett.* **13**(5), 1246-1249 (2011).
52. Zhao, J. et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**(11), 2100-2104 (2012).
53. Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. & Kirtikara, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochem.* **69**(3), 783-787 (2008).
54. Cole, R.J. et al. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 826-830 (1977).
55. Pinheiro, E.A. et al. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat. Prod. Res.* (2012). In press DOI: 10.1080/14786419.2012.750316.
56. Debbab, A. et al. Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(2), 229-234 (2009).
57. Imlach, W.L., Finch, S.C., Dunlop, J. & Dalziel, J.E. Structural determinants of lolitrems for inhibition of BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **605**(1-3), 36-45 (2009).
58. Xu, S. et al. Cytotoxic Cytochalasin Metabolites of Endophytic *Endothia gyrosa*. *Chem. Biodivers.* **6**(5), 739-745 (2009).
59. Ortega, H.E. et al. Mycoleptodiscins A and B, Cytotoxic Alkaloids from the Endophytic Fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194. *J. Nat. Prod.* (2013). In press DOI: 10.1021/np300792t.
60. Ferreira Koolen, H.H. et al. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L.f. *Quím. Nova.* **35**(4), 771-774 (2012).
61. Shen, L. et al. Structure and Total Synthesis of Aspernigerin: A Novel Cytotoxic Endophyte Metabolite. *Chem. Eur. J.* **12**(16), 4393-4396 (2006).
62. Zhang, H., Ma, Y., Liu, R. & Zhou, F. Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. *Biochem. Sys. Ecol.* **45**, 31-33 (2012).
63. Isaka, M., Berkaew, P., Intereya, K., Komwijit, S. & Sathitkunanon, T. Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. *Tetrahedron* **63**(29), 6855-6860 (2007).
64. Shiono, Y. et al. A dimeric pyrrocidine from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochem. Lett.* **5**(1), 91-95(2012).
65. Song, Y.C., Huang, W.Y., Sun, C., Wang, F.W. & Tan, R.X. Characterization of graphis lactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(3), 506-509 (2005).
66. Bultman, T.L. & Leuchtman, A. Biology of the *Epichloë-Botanophila* interaction: An intriguing association between fungi and insects. *Fungal Biol. Rev.* **22**(3-4), 131-138 (2008).
67. Hughes, C.C., Kennedy-Smith, J.J. & Trauner, D. Synthetic Studies toward the Guanacastepenes. *Org. Lett.* **5**(22), 4113-4115 (2003).
68. Qin, J.C. et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**(6), 1572-1574 (2009).
69. Sumarah, M.W. et al. Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. *Phytochemistry* **71**, 760-765 (2010).
70. Liu, L. et al. Chloropupukeanin, the First Chlorinated Pupukeanane Derivative, and Its Precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Org. Lett.* **10**(7), 1397-1400 (2008).
71. Basilio, A. et al. The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorg. Med. Chem.* **14**(2), 560-566 (2006).
72. Elsaesser, B. et al. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. *Eur. J. Org. Chem.* **21**, 4563-4570 (2005).
73. Strobel, G. & Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(4), 491-502 (2003).
74. Yu, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microb. Res.* **165**, 437-449(2010).
75. Gamboa, M.A., Laureano, S. & Bayman, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathol.* **156**, 41-45 (2002).
76. Rodriguez, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe Oleracea*. *Mycol.* **86**, 376-385(1994).
77. Ko Ko, T.W., Stephenson, S.L., Bahkali, A.H. & Hyde, K.D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? *Fungal Divers.* **50**, 113-120 (2011).
78. Montesinos, E. et al. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* **5**, 169-175 (2010).
79. Mejía, L.C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biolog. Cont.* **46**, 4-14 (2008).
80. Waqas, M. et al. Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules* **17**, 10754-10773 (2012).
81. Rubini, M.R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 24-33 (2005).
82. Bhagobaty, R.K. & Joshi, S.R. Promotion of seed germination of Green gram and Chick pea by *Penicillium verruculosum* RS7PF, a root endophytic fungus of *Potentilla fulgens* L. *Adv. Biotech.* **8**(12), 7-15 (2009).
83. Neilan, B.A., Pomatia, F., Nettinga, A.G. & Calamarib, D. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* **67**(4), 387-396 (2004).
84. Mann, R.S & Kaufman, P.E. Natural Product Pesticides: Their Development, Delivery and use against Insect Vectors. *Rev. in Org. Chem.* **9**, 185-202 (2012).
85. Homan, A.M. et al. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochem.* **69**, 1049-1056 (2008).
86. Rhoden, S.A., Garcia, A., Bongiorno, V.A., Azevedo, J.L. & Pamphile, J.A. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* a. Juss. *JAPS* **2**(8), 57-59 (2012).
87. Rosa, L.H. et al. Antifungal activity of extracts from endophytic

- fungi associated with *Smallanthus* maintained *in vitro* as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Can. J. Microbiol.* **58**, 1202–1211 (2012).
88. Zhu, J.W. *et al.* Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiations and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* **8**, 455-463 (2000).
89. Weber, D. *et al.* Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibiot.* **57(9)**, 559-563 (2004).
90. Dompeipen, E.J., Srikandace, Y., Suharso, W.P., Cahyana, H. & Simanjuntak, P. Potential endophytic microbes selection for antidiabetic bioactive compounds production. *Asian J. of Biochem.* **6**, 465-471 (2011).
91. Mata, R. *et al.* Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochem.* **68(15)**, 2087-2095 (2007).
92. Schmeda-Hirschmann, G., Hormozabal, E., Astudillo, L., Rodríguez, J. & Theoduloz, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J. Microbiol. Biotech.* **21(1)**, 27-32 (2005).
93. Mayorga, P., Pérez, K. R., Cruz, S.M. & Cáceres, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Braz. of Pharmacog.* **20**, 897-903 (2010).
94. Morettia, A., Muléa, G., Ritienib, A. & Logriecoa, A. Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex. *Int. J. of Food Microbiol.* **118(2)**, 158-163 (2007).
95. Guimaraes, D.O. *et al.* Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 134-144 (2008).
96. DiMasi, J.A., Hansen, R.W. & Grabowski, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. of Health Econ.* **22**, 151-185 (2003).
97. Baskin-Bey, E.S. *et al.* Clinical trial of the pan-caspase inhibitor, IDN-6556, in human liver preservation injury. *Am. J. of Trans.* **7**, 218-225 (2007).
98. Sánchez Fernández, R.E. Determinación del potencial alelopático de los extractos del medio de cultivo y del micelio de un hongo endófito aislado de *Lonchocarpus castilloi* (Fabaceae). Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2010) 87 págs.
99. Armendáriz Guillén, B. Hongos endófitos productores de metabolitos secundarios con potencial fitotóxico y antifúngico. Tesis de Licenciatura (Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2013) 106 págs.