

**MÁSTER PROPIO EN AGROECOLOGÍA, SOBERANÍA
ALIMENTARIA, ECOLOGÍA URBANA Y COOPERACIÓN
AL DESARROLLO RURAL**

**Bioprospección de hongos endófitos de *Neochamaelea
pulverulenta* para el control de plagas agrícolas**

CURSO 2021 – 2022

Alumna: Andrea García Hernández

Tutora: Nancy Montero Gómez (ICIA)

Cotutora: Carmen Elisa Díaz Hernández (IPNA-CSIC)

La Laguna, Noviembre 2022



FUNDACIÓN
INSTITUTO DE
AGRICULTURA
ECOLÓGICA
Y SOSTENIBLE



Bioprospección de hongos endófitos de *Neochamaelea pulverulenta* para el control de plagas agrícolas

Resumen

En los últimos años, las restricciones impuestas sobre el uso de pesticidas sintéticos en la Unión Europea como consecuencia de la entrada en vigor de nuevas normativas en materia de seguridad alimentaria han derivado en una creciente demanda de bioplaguicidas, los cuales se presentan como una alternativa sostenible y respetuosa con el entorno natural, además de menos perjudicial para la salud humana. Los bioplaguicidas para la protección de plantas incluyen sustancias naturales y son componentes clave de los programas de manejo integrado de plagas (MIP), cuyo objetivo es reducir la carga de productos químicos sintéticos utilizados para controlar las enfermedades de las plantas. Dentro de la categoría de bioplaguicidas microbianos, los hongos endófitos han emergido como un valioso recurso al tratarse de microorganismos que viven en el interior de los tejidos de las plantas sin causarles síntomas aparentes de enfermedad que, además, juegan un importante papel en la promoción del crecimiento y en la resistencia al estrés y enfermedades de la planta hospedante mediante la producción de diversas sustancias bioactivas.

En el presente trabajo se llevará a cabo una bioprospección a nivel de hongos endófitos asociados a *Neochamaelea pulverulenta*, una especie endémica de las Islas Canarias, con la finalidad de buscar bioplaguicidas microbianos para la protección de cultivos. Se realizarán fermentaciones fúngicas para la producción de biomasa, obteniéndose extractos que serán analizados en busca de efectos contra determinadas plagas y enfermedades de los cultivos para una posterior ampliación de la producción de bioplaguicidas interesantes. Se evaluará tanto la actividad fungicida de los extractos obtenidos frente a diferentes hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*) como sus efectos fitotóxicos frente a monocotiledóneas (*Lolium perenne*) y dicotiledóneas (*Lactuca sativa*) con el objeto de determinar su posible aplicación en el control de fitopatógenos fúngicos y/o malas hierbas como agentes fungicidas y/o herbicidas.

Palabras clave: agricultura sostenible, productos naturales, control biológico, hongos endófitos, *Neochamaelea pulverulenta*

Autora: Andrea García Hernández

Tutora académica: Nancy Montero Gómez (ICIA)

Tutora externa: Carmen Elisa Díaz Hernández (IPNA-CSIC)

La Laguna, 21 de octubre de 2022

Yo, Andrea García Hernández autorizo el acceso y divulgación del presente documento

Nancy Montero Gómez, Profesora del Máster Propio en Agroecología, Soberanía Alimentaria, Ecología Urbana y Cooperación al Desarrollo Rural de la Universidad de La Laguna e Investigadora del Área de Entomología de la Unidad de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), y Carmen Elisa Díaz Hernández, Investigadora del Departamento de Biotecnología y Química de Productos Naturales del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC)

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “Bioprospección de hongos endófitos de *Neochamaelea pulverulenta* para el control de plagas agrícolas”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D/Dña. Andrea García Hernández, para su presentación como Trabajo Fin de Máster en el Máster Propio en Agroecología, Soberanía Alimentaria, Ecología Urbana y Cooperación al Desarrollo Rural de la Universidad de La Laguna.

Y para que conste firma/n el presente certificado en La Laguna, a 21 de Octubre de 2022.

Fdo. Nancy Montero Gómez



Índice

<u>INTRODUCCIÓN</u>	5
SITUACIÓN ACTUAL DE LA AGRICULTURA	6
MÉTODOS ALTERNATIVOS	8
BIOPLAGUICIDAS MICROBIANOS	9
FLORA ENDÉMICA COMO FUENTE DE BIOPESTICIDAS: NEOCHAMAELEA PULVERULENTA.....	11
<u>OBJETIVOS</u>	13
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	15
MATERIAL VEGETAL	16
OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS	16
IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.....	17
IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA	17
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	17
ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD	17
CONSERVACIÓN	18
FERMENTACIONES Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS	18
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	19
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	19
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC)	19
BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD	19
ANTIFÚNGICO	19
FITOTOXICIDAD	20
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	22
AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE N. PULVERULENTA	23
IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.....	24
ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD	25
FERMENTACIONES Y PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS	25
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	27
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FITOTÓXICA.....	29
<u>CONCLUSIONES</u>	33
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	35

INTRODUCCIÓN

Introducción

Situación actual de la agricultura

En 1950 se estimaba que 2.600 millones de personas habitaban nuestro planeta. Casi 50 años después, en 1999, esta cifra ya había alcanzado los 6.000 millones. En base a este drástico crecimiento poblacional experimentado en las últimas décadas, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) pronostica que la población mundial crecerá un 34% para el año 2050, llegando a superar los 9.000 millones de personas (United Nations, 2019). Esta situación pone bajo una enorme presión al sector primario, el cual debe alimentar a una población cada vez mayor al mismo tiempo que la productividad de la tierra decae cada día que pasa (Toth y Szigeti, 2016).

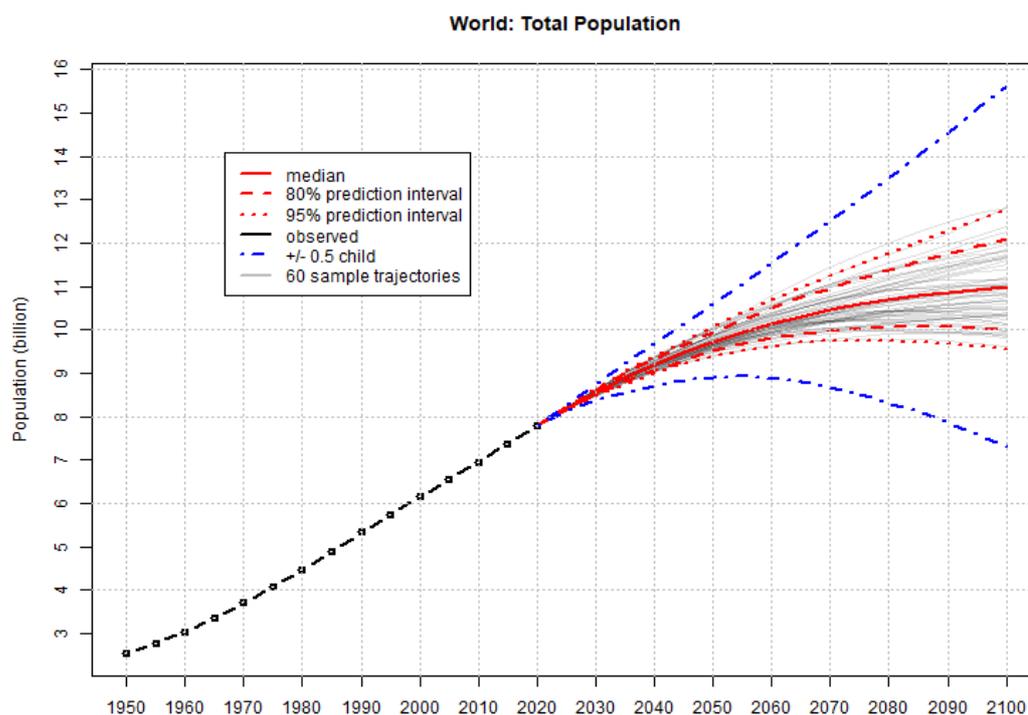


Figura 1. Estimaciones (1950–2020) y proyecciones probabilísticas (2020–2100) de la población mundial total. En el gráfico se representa la trayectoria mediana, los intervalos de predicción del 80% y el 95% de las proyecciones probabilísticas y las variantes alta y baja (+/- 0,5 nacimientos con respecto a la variante media). Figura tomada de United Nations, 2019.

Con el fin último de erradicar el hambre en el mundo, tras la Segunda Guerra Mundial empezó a extenderse por Occidente una agricultura moderna basada en la explotación intensiva de las tierras, con gran especialización en pocas especies y variedades (principalmente cereales: maíz, trigo y arroz) y con una fuerte carga tecnológica. Para conseguir sus objetivos, este sistema de producción se apoyaba en cuatro pilares fundamentales: la maquinaria agrícola, la industria agroquímica (pesticidas sintéticos y abonos nitrogenados), la biotecnología y los sistemas de riego (Altieri, 1999). Si bien es cierto que, la introducción de estos nuevos métodos ayudó a aliviar en cierto modo la prevalencia de esta aflicción, las altas dependencias de insumos externos para mantener las altas productividades han generado a largo plazo, más que resuelto, problemas de cara al desarrollo de la agricultura contemporánea (Sethi *et al.*, 2022). Así, actualmente hacemos frente a 811 millones de personas subalimentadas en el año 2020 (ONU, 2021), a un deterioro del patrimonio natural (contaminación atmosférica, de recursos hídricos

y edáficos; pérdida de biodiversidad) como consecuencia de los cambios en el uso del suelo; a la producción de alimentos con baja calidad nutricional (altos en calorías pero deficientes en proteínas, vitaminas y minerales) que, además, presentan residuos de pesticidas que sobrepasan los límites tolerables; y a unos sobredimensionados costes energéticos derivados de su alta dependencia de energías fósiles.

El problema principal radica en que los agroecosistemas modernos se han planteado como si se tratasen de algo ajeno a la propia naturaleza, destruyéndose importantes comunidades vegetales repletas de especies únicas para establecer, en su lugar, grandes extensiones conformadas por plantas genéticamente homogéneas que necesitan de ingentes cantidades de agua, pesticidas y fertilizantes para cumplir con sus expectativas de crecimiento. En consecuencia, los ecosistemas resultantes se han convertido en una versión estructural y funcionalmente simplificada de sus contrapartes naturales, carentes de cualquier mecanismo de autorregulación y, por tanto, altamente susceptibles a las inclemencias climáticas (cada vez más frecuentes debido al cambio climático) y a la incidencia de plagas y enfermedades (Nicholls *et al.*, 2015).

Esto crea una situación insostenible desde el punto de vista tanto económico como social y medioambiental. Como respuesta, se ha visto en los últimos años una proliferación en la puesta en práctica de los principios agroecológicos, fundamentados en el policultivo (sistemas intercalados con mezcla de variedades y diversificación temporal), un manejo orgánico del suelo (mediante la aplicación de estiércoles o compost, el uso de cultivos cobertura, ...), un control biológico de las plagas (haciendo uso de la alelopatía negativa que exhiben determinados organismos) y la independencia de insumos externos (optimizar el uso eficiente de los mismos y sustituir los sintéticos por orgánicos) (Altieri, 1999).

Está claro que la única forma de garantizar la seguridad alimentaria a nivel mundial es produciendo más alimentos de forma sostenible e inofensiva. Los sistemas agrícolas sostenibles, inspirados en la agroecología, son económicamente viables, cumplen con los requisitos de la sociedad de alimentos inocuos y nutritivos, preservan el vigor y el dinamismo en la expansión agrícola, conservan o mejoran los recursos naturales y la calidad ambiental para las generaciones futuras y, además, facilitan el cumplimiento de la mayoría de las metas referentes a varios de los Objetivos de Desarrollo Sostenible propuestos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) (Sethi *et al.*, 2022). Referente a esto último, resalta que de estos 17 objetivos adoptados con el propósito de lograr un mundo sostenible para el año 2030, ocho de ellos mantienen una relación directa con la agricultura, destacando así el papel central que juega esta en nuestra lucha contra la pobreza, el hambre y la desigualdad, en la respuesta frente al cambio climático y en la conservación de nuestros recursos naturales.

Actualmente, uno de los mayores problemas a los que hace frente la agricultura sostenible a la hora de proporcionar alimentos saludables y seguros para el consumo humano en cantidades suficientes lo constituye la incidencia de plagas y enfermedades. Un sistema agrícola sostenible debe encontrar el equilibrio entre las necesidades de producción y el apoyo del que depende el sistema agrícola, siendo la gestión de plagas un aspecto fundamental para su desarrollo. Hasta ahora se ha estado practicando un uso indiscriminado de agroquímicos para hacer frente a este problema, a pesar de las múltiples externalidades negativas que su aplicación conlleva, contribuyendo a la acumulación de residuos tóxicos en los alimentos, el suelo, el aire y el agua,

entre otras cosas. Es por ello que resulta necesario realizar más investigaciones acerca de los insecticidas y su degradación, así como de métodos alternativos que ayuden a evitar no sólo los impactos sobre organismos no objetivo, sino también a promover el acceso a agua limpia libre de químicos (ODS 6), reducir la presencia de contaminante en alimentos y agua mejorando la salud (ODS 3), fomentar el consumo responsable y producción de insecticidas (ODS 12), y reducir el impacto en la biodiversidad tanto acuática (ODS 14) como terrestre (ODS 15) (Sethi *et al.*, 2022).

Métodos alternativos

En varios estudios se ha constatado la aparición de cambios en la microbiota (Hartmann *et al.* 2015), fertilidad y actividad enzimática de los suelos (Malik *et al.* 2017), en el ciclo del nitrógeno (Damin y Trivelin, 2011) y en el crecimiento de la vegetación (Malik *et al.* 2017) como consecuencia directa del uso de pesticidas tradicionales. Esto es debido en gran medida a que estos productos fitosanitarios, aplicados con la finalidad de prevenir, destruir o controlar cualquier especie dañina para las cultivos, suelen tener un amplio espectro de actuación con el objeto de abarcar el mayor número de posibles amenazas, conllevando su posible actuación sobre organismos no objetivo entre los cuales se encuentran los microorganismos que habitan el suelo, las plantas y animales silvestres e, incluso, los humanos, que consumimos los productos generados. Además, debido a que generalmente se tratan de compuesto químicos con una estructura muy compleja, no existen microorganismos con enzimas que sean capaces de descomponerlos, desencadenando su persistencia por largos periodos de tiempo en el suelo y fuentes de agua, contaminándolos, o en el interior de los organismos, intoxicándolos (Grumezescu, 2017; Ortiz-Hernández *et al.*, 2013). Estas razones dejan claro, por tanto, que el manejo de plagas y patógenos basado únicamente en la aplicación de pesticidas químicos es insostenible.

Entre las consecuencias más graves derivadas del uso descontrolado e indiscriminado de pesticidas sintéticos destaca el aumento en la incidencia de plagas cada vez más resistentes a los métodos de control, así como una acumulación excesiva de residuos en suelo, agua y plantas que suponen una amenaza tanto para la flora y fauna silvestres como para la salud humana. Con respecto a esto último, se ha determinado que los altos niveles de residuos de pesticidas detectados en la cadena alimentaria son capaces de causar diversos riesgos sanitarios entre los que se encuentra la disfunción orgánica, la supresión inmunológica, la neurotoxicidad o el deterioro de la función reproductiva y la carcinogenicidad, conduciendo incluso a la muerte (Sethi *et al.*, 2022).

En los últimos años, la mayor conciencia pública adquirida en esta materia ha llevado al desarrollo de estrategias de control alternativas. Leyes recientes como la Ley de Protección de la Calidad de los Alimentos y la Directiva sobre el Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios (EU 128/2009/EG) restringen el uso de muchos los productos fitosanitarios utilizados habitualmente en campo debido a los efectos negativos provocados (Sethi *et al.*, 2022). Así, actualmente se apuesta por el control biológico de las plagas, basado en el aprovechamiento de la entomofauna auxiliar y de los metabolitos producidos por muchos organismos, como parte esencial de los programas de manejo integrado de plagas con la finalidad hacer frente a estas amenazas.

Una alternativa factible al uso de plaguicidas sintéticos convencionales, capaz de promover prácticas agrícolas sostenibles para la salud humana y el medio ambiente, la constituyen los bioplaguicidas. Los bioplaguicidas son organismos o compuestos naturales que suprimen el crecimiento y la proliferación de poblaciones de plagas mediante diversos mecanismos de acción, excluyéndose aquellos que interfieren con el sistema nervioso de los organismos diana (Fenibo *et al.*, 2021). Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), estos pueden ser clasificados en tres categorías: (1) compuestos naturales capaces de controlar plagas (pesticidas bioquímicos), (2) microorganismos capaces de controlar plagas (pesticidas microbianos) y (3) sustancias plaguicidas producidas por plantas que contienen material genético añadido (protectores incorporados a las plantas). En contraposición a los pesticidas tradicionales, estos se caracterizan por ser biodegradables; altamente específicos, únicamente afectan a una especie o género de determinados organismos, de forma que no hay riesgo de toxicidad frente a organismos no objetivo; y, sus modos de acción complejos retrasan el desarrollo de posibles resistencias por parte de las plagas (Singh *et al.*, 2016; Vieira Costa *et al.*, 2019).

Bioplaguicidas microbianos

Se estima que las plagas y patógenos provocan a nivel mundial pérdidas de rendimiento anuales en los cultivos de entre un 30 y un 50%, contribuyendo a la prevalencia de la desnutrición y la pobreza en nuestro planeta (Mousa y Raizada, 2013). Estas cifras reafirman que, si se quiere llegar a garantizar la seguridad alimentaria en un contexto de crecimiento poblacional, la pérdida de cosechas debido a factores bióticos debe ser abordada de forma eficaz. Hasta ahora se ha estado haciendo uso de pesticidas sintéticos para controlar la incidencia de estos organismos dañinos. Sin embargo, las restricciones impuestas recientemente sobre el uso de varios de estos productos químicos motivadas por los problemas medioambientales que generan, unidas a una mayor demanda por parte de los consumidores de productos naturales inocuos y libres de residuos, han ejercido una gran presión sobre gobiernos e industrias agrícolas, impulsando la búsqueda de tecnologías alternativas y limpias en la producción de plantas. Así, un enfoque alternativo poco explorado, pero prometedor, que está ganando atención últimamente es el uso de microorganismos como agentes de control biológico para la protección de cultivos (Grabka *et al.*, 2022). En este contexto, los hongos endófitos representan una fuente potencial de interesantes productos naturales bioactivos con posible actividad biopesticida (Tawfike *et al.*, 2017).

Los hongos endófitos son microorganismos eucariotas capaces de colonizar los tejidos internos de las plantas sin causar ningún efecto negativo aparente e inmediato en sus huéspedes (Tawfike *et al.*, 2017). Pueden vivir tanto en el espacio intercelular (apoplasto) de los tejidos vegetales vivos como en el interior de las células (simplasto) (Giménez *et al.*, 2007), estableciendo una asociación planta-microbio única, similar a una simbiosis, en la que ninguno de los socios que interactúa se ve perjudicado significativamente y de la que ambos organismos se benefician (Kusari *et al.*, 2012).

Como parte de la planta, los endófitos juegan un papel fundamental en la promoción del crecimiento de esta, así como en su respuesta y tolerancia frente a diferentes estreses. Referente a la modulación del desarrollo, en estudios anteriores se ha determinado que estos

microorganismos tienen la capacidad de producir moléculas señalizadoras de plantas (como el óxido nítrico) y reguladores del crecimiento (como las auxinas y el etileno). En cuanto a sus contribuciones en la defensa de la planta, se sabe que algunos endófitos producen y excretan metabolitos secundarios con actividad antifúngica, antibacteriana o insecticida, que ayudan a suprimir o reducir la incidencia de plagas sobre el huésped. Por ejemplo, recientemente se ha determinado que el extracto de una especie de *Aspergillus* aislada de la planta *Bethencourtia palmensis* (Nees) Choisy contiene melleína y ácido neoaspergílico, ambos compuestos antifúngicos conocidos (Morales-Sánchez et al., 2021). Otros endófitos, en cambio, protegen a la planta induciendo mecanismos de defensa por resistencia sistémica adquirida (SAR) o resistencia sistémica inducida (ISR). Un ejemplo de este último caso lo constituye *Piriformospora indica*, el cual induce una respuesta de defensa dependiente del ácido jasmónico en *Arabidopsis thaliana* L. mediante la co-inoculación con un patógeno (Grabka et al., 2022).

En relación con esto último, la presencia de plantas adventicias, bajo ciertas condiciones, en tierras de cultivo pueden ocasionar mayores pérdidas económicas a la agricultura que las plagas de insectos y hongos patógenos. Además de competir con el cultivo por el agua, la luz, los nutrientes y el espacio, funcionan como un reservorio de plagas, provocando una disminución del rendimiento y un incremento de los costes de producción (Suryanarayanan, 2019). Un posible método de control frente a especies invasoras o adventicias podría basarse en la explotación del fenómeno de interferencia del endobioma exhibido por la fauna endófito. Las relaciones simbióticas establecidas entre una planta huésped y sus microorganismos endófitos son únicas, de forma que cuando estos son introducidos en otras plantas a las que no están adaptados, pueden tener efectos adversos, reprimiendo el crecimiento del vegetal e incluso ocasionándole la muerte. Esto es lo que se conoce como interferencia del endobioma (White et al., 2019). En la bibliografía se han descrito varios casos en los que la inoculación de hongos endófitos aislados en plantas nativas en plantas exóticas ha provocado una represión del crecimiento de estas últimas (White et. al, 2018). Esto podría indicar que se trata de fenómeno común dado en las comunidades vegetales naturales con el propósito de reducir el crecimiento de las plantas competidoras.

A pesar de que casi todas las plantas vasculares albergan uno o más endófitos, debido a la ausencia de signos de colonización aparentes en la planta huésped, estos organismos no habían sido tenidos en cuenta hasta ahora como posibles fuentes de metabolitos bioactivos. Sin embargo, los avances conseguidos en los últimos años en el cultivo de microorganismos y en la química de productos naturales ha posibilitado el acceso a esta infinita reserva de diversidad metabólica que constituyen los organismos endófitos; con la ventaja, además, de poder llevar a cabo una producción eficiente con mayores rendimientos a bajo costo a través del cultivo a gran escala. Es por ello que, ahora mismo, el mundo científico internacional está volcando su atención en el aislamiento de hongos endófitos y el estudio de sus productos naturales (Tawfike et al., 2017).

Flora endémica como fuente de biopesticidas:

Neochamaelea pulverulenta

Neochamaelea pulverulenta (Vent) Erdtman es una especie arbustiva endémica del archipiélago canario, presente en las islas de La Gomera, Tenerife y Gran Canaria. Estudios filogenéticos recientes sugieren que podría tratarse de un neendemismo originado en las islas durante el Mioceno a partir de un antecesor común africano compartido con *Cneorum tricocon* L., una especie exclusiva del Mediterráneo occidental (Pérez Méndez *et al.*, 2017).

Aunque en un principio se consideró que, junto a *Cneorum tricocon* L. y *Cneorurn trirneron*, conformaba la familia Cneoraceae dentro del orden Sapindales, la última versión publicada del sistema para la clasificación de las angiospermas según criterios filogenéticos (APG IV) asigna a estos dos géneros a la familia Rutaceae. Destaca, a modo de curiosidad, que, durante mucho tiempo estas tres especies descritas, con una distribución en el Mediterráneo, Canarias y Cuba, constituyeron una de las disyunciones geográficas entre plantas vasculares más intrigantes (Lorenzo, 2003); hasta que, recientemente se confirmó que en Cuba el taxón tratado como *Cneorurn trirneron* es en realidad *Schoepfia stenophylla* (Oviedo *et al.*, 2009).

Referente a su distribución, es una especie relativamente común, encontrada a lo largo de las tierras bajas xerofíticas (< 400 m.s.n.m), donde la temperatura media es de 21°C y la precipitación media anual es inferior a los 300 mm, formando parte de la vegetación arbustiva que acompaña a los tabaibales dulces y cardonales (Pérez Méndez *et al.*, 2017).

Se trata de un arbusto de escaso porte (entre 0,5 y 1,5 m de altura) y ramificación abundante que presenta hojas simples, blanquecinas, de consistencia dura y más o menos linear-oblanceoladas dispuestas de forma alterna. Desde el punto de vista reproductivo, se manifiesta como androdioico, con individuos monoicos provistos de flores masculinas e individuos con flores hermafroditas, aunque funcionalmente masculinas o femeninas. Las flores, de pedúnculos cortos, se insertan de forma axilar en la base de las hojas, donde pueden permanecer en solitario o agruparse a modo de inflorescencias (más abundantemente cuando se tratan de flores masculinas) y son fundamentalmente tetrámeras. (Pérez de Paz *et al.*, 2013). Los frutos, casi esféricos y carnosos, están revestidos de una fina capa cérea y presentan una coloración verde al principio que se torna marrón-rojiza en la madurez. La reproducción tiene lugar principalmente por medio de semillas que son únicamente dispersadas por los lagartos frugívoros endémicos del género *Gallotia* (Lacertidae) (Pérez Méndez *et al.*, 2014).

Conocida vulgarmente como leña santa, leña buena, leña blanca u orijama, esta especie ha sido muy utilizada en medicina popular debido a las innumerables propiedades medicinales que posee. Las decocciones e infusiones se han empleado para curar una gran variedad de afecciones y dolencias, desde el asma y la diabetes hasta las almorranas, siendo el tallo en infusión la parte más apreciada. Asimismo, en veterinaria, los frutos se han utilizado para curar la tetera de las cabras y para expulsar la placenta de estos animales. Entre otros usos y aplicaciones se encuentran también los relacionados con su madera, la cual ha sido utilizada para hacer bastones, lanzas de pastor además de diversos utensilios y enseres. Pero, sobre todo, destaca el empleo que hacían los aborígenes de algunas islas de los frutos y semillas de esta planta, los

cuales han sido encontrados junto a las momias enterradas en algunos túmulos (Gran Canaria) debido a su capacidad para repeler insectos y otros animales devoradores de cadáveres.

Por último, señalar que esta especie ha sido objeto de numerosos estudios fitoquímicos, en los cuales se han obtenido a partir de la parte aérea de la planta diferentes cromeno-cromonas (3,3-dimetil-alil -espatheliacromeno, neochamelina, alloptaeroxylina y pulverocromenol), la oxepino cromona acetato de ptaeroxylinol y la cumarina cudrelopsina; mientras que, de los frutos se han aislado el 3,3-dimetil-alil-espatheliacromeno, el espatheliabiscromeno y la metil pulverina (González *et al.*, 1977).



Figura 2. Fotografías de un ejemplar silvestre de *Neochamaelea pulverulenta*. Fuente: University of Trieste, Italy - CC BY-SA.

En función de lo anteriormente expuesto, se propone investigar la actividad antifúngica y fitotóxica de los hongos endófitos aislados del endemismo *Neochamaelea pulverulenta*, con el objeto de hacer uso de nuestro patrimonio natural para resolver una de las problemáticas más acuciante de nuestra sociedad: obtener agentes fitosanitarios más eficaces y seguros, tanto desde el punto de vista sanitario como ecológico, que contribuyan a un crecimiento sostenible.

OBJETIVOS

Objetivos

Se plantea como objetivo general del presente Trabajo de Final de Máster la búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios microbianos a partir de extractos de hongos endofíticos aislados de una especie endémica de las Islas Canarias, *Neochamaelea pulverulenta*.

Para la consecución del mismo, se pretenden abordar los siguientes objetivos específicos:

- Aislar hongos endófitos de tallo y hojas de un ejemplar de la especie endémica *Neochamaelea pulverulenta* recolectada en su hábitat natural.
- Identificar los aislados obtenidos en base a las características morfológicas y el análisis comparativo de las secuencias de ITS con aquellas depositadas en Gen Bank.
- Realizar fermentaciones en medio líquido de los aislados para la obtención de microextractos fúngicos.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos fúngicos obtenidos frente a diferentes especies de hongos fitopatógenos.
- Determinar los efectos fitotóxicos frente a plantas mono y dicotiledóneas de los extractos fúngicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

Material vegetal

El ejemplar silvestre de *Neochamaelea pulverulenta* fue recolectado en diciembre de 2021 a partir de una población natural ubicada en el Parque Rural de Teno (Tenerife, España). Se tomaron muestras de las partes aéreas de la planta (tallos y hojas) que aparentemente no presentaban ningún síntoma de enfermedad o de lesión causadas por organismos patógenos. Este material fue entonces introducido en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y trasladado al laboratorio.

Obtención y aislamiento de los hongos endófitos

El material vegetal se separó por un lado en hojas y por otro, en tallos, para luego ser esterilizado superficialmente bajo condiciones de asepsia y en el interior de una cabina de flujo laminar vertical Telstar AV-100. Para ello, se realizaron lavados secuenciales del material con etanol al 75% durante 1 minuto e hipoclorito sódico al 65% durante 10 minutos y, finalmente, se enjuagó dos veces con agua destilada estéril y se secó con papel de filtro estéril.

La eficacia del tratamiento de esterilización se comprobó realizando de forma simultánea una impresión de las huellas de los tejidos vegetales, así como una inoculación del agua del lavado final sobre placas Petri que contenían los mismos medios empleados para el aislamiento. Estas fueron entonces incubadas a modo de control en una cámara de cultivo bajo las condiciones descritas posteriormente.

Para el aislamiento de los hongos endófitos a partir del material vegetal estéril se prepararon dos medios de cultivo: PDA (Potato Dextrose Agar) y MEA (Malt Extract Agar); ambos suplementados con el antibiótico cloranfenicol (50 mg/L) para evitar cualquier crecimiento bacteriano. Una vez esterilizados los medios, estos fueron distribuidos en placas de Petri (9 cm de diámetro) bajo un ambiente aséptico. Cada muestra estéril de tallos y hojas fue cortada en pequeños trozos (de 1 a 2 cm) con ayuda de un bisturí, y los explantos resultantes fueron sembrados en las placas de Petri preparadas anteriormente. Se sembraron de 3 a 4 explantos por placa, estableciéndose 5 repeticiones por cada órgano de la planta y para cada medio empleado. Posteriormente, estas placas fueron selladas con parafilm, para evitar la desecación, e incubadas en una cámara de cultivo a una temperatura de 26°C y bajo un régimen de oscuridad. Las placas fueron examinadas periódicamente para verificar el crecimiento de hifas fúngicas a partir de los explantos y, a medida que los hongos endófitos fueron creciendo, se repicaron en otras placas con su respectivo medio para la obtención de cultivos puros.

La esterilización del material y de los medios de cultivo se realizó en un autoclave Selecta mod. Auster 437-G en las condiciones estándar de 1,2 atmósferas de presión y una temperatura de 120°C durante 25 minutos.

Identificación de los aislados

Identificación microscópica

Las cepas fúngicas obtenidas en el aislamiento fueron agrupadas tentativamente en base a su parecido macroscópico. Para ello, se tuvo en cuenta la morfología y coloración que presentaba el micelio tanto en el anverso como en el reverso, la coloración de la masa de esporas y la presencia de algún pigmento difusible en el medio de cultivo empleado. Las colonias similares en forma, color y tamaño fueron observadas en fresco con agua destilada haciendo uso de un microscopio óptico con el objetivo de hacer una primera identificación de los mismos a partir de características distintivas observadas en esporas, micelio y estructuras reproductoras y poder así agruparlas o segregadas en diferentes aislados.

Identificación molecular

Las diferentes cepas de hongos fueron identificadas a nivel molecular mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación del operón ribosomal (ITS1-5.8S-ITS2) de su ADNr (Arenal *et al.*, 2000) en el Servicio de Genómica del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) perteneciente a la Universidad de La Laguna (ULL).

La metodología empleada consistió en la extracción del ADN genómico de los aislados fúngicos utilizando el DNeasy Plantmini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany, Cat. No 69104) y su posterior amplificación por PCR de la región espaciadora del transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal (ADNr). El ADN genómico (100–200 ng) se amplificó en un PTC-200 Termociclador (MJ Research, San Diego, CA, EE. UU.) en un volumen final de 25 µL con el kit comercial AmpONE Taq DNA polimerasa PCR kit (GeneAll, Seúl, Corea) y los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en las bases de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), considerándose válida la identificación a nivel de género cuando el porcentaje de homología entre la secuencia obtenida y la existente en Gen Bank era igual o superior al 95% y, a nivel de especie, cuando este era igual o superior al 99%.

Análisis de la diversidad

La diversidad y distribución endofítica se estudió mediante el cálculo de la frecuencia relativa (RF) del aislamiento. Este índice se usa para representar la densidad fúngica, es decir, determina el número de veces que aparece una especie en el aislamiento. Se calcula como el número total de aislados pertenecientes a una misma especie dividido entre el número total de aislados (Huang *et al.*, 2008) según la siguiente fórmula y se expresa como porcentaje:

$$FR = \frac{N \text{ aislados}}{N \text{ total}} \times 100$$

Conservación

Una vez obtenidos los aislados puros siguiendo la metodología descrita anteriormente, estos fueron conservados empleando dos técnicas diferentes:

- **Congelación:** utilizando un sacabocado estéril se cortaron de 3 a 4 fragmentos del hongo que se transfirieron a microtubos roscados estériles de 2 ml que contenían 1 ml de glicerol al 15% (Sigma-Aldrich). Estos tubos se dejaron 30 minutos en nevera como parte de un proceso de adaptación antes de ser almacenados en un ultracongelador a -80°C .
- **Conservación en aceite mineral:** utilizando un sacabocado estéril se cortaron de 3 a 4 fragmentos del hongo que fueron transferidos a microtubos roscados estériles de 2 ml que contenían 1 ml de parafina líquida estéril (Merck) y almacenados en nevera a 4°C .

Fermentaciones y preparación de los extractos fúngicos

Con la finalidad de obtener los microextractos de los hongos endófitos objeto de estudio se realizaron fermentaciones en medio líquido. Así, las cepas que habían crecido en PDA se subcultivaron en caldo Czapek modificado (Morales-Sánchez *et al.*, 2021); mientras que, las que se habían aislado en MEA se subcultivaron en MEB (Malt Extract Broth).

Con la intención de partir de un inóculo común para cada cepa y disminuir el tiempo de la fase de latencia inicial del cultivo durante su fermentación en medio líquido, se preparó un preinóculo para cada una. Bajo una cabina de flujo laminar vertical Telstar AV-100 se añadieron 10 ml de agua destilada sobre el aislado cultivado en medio sólido. Con una espátula estéril se raspó suavemente la superficie del micelio y se transfirió la suspensión resultante al Erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio. Los cultivos se incubaron en la cámara de cultivo en un agitador orbital a 100 rpm durante 3 días. El proceso de inoculación consistió en tomar 10 ml del preinóculo con una pipeta automática de 5 ml con la punta cortada para verterlos en cada Erlenmeyer que contenía 200 ml de medio, todo ello bajo condiciones de asepsia en el interior de una cabina de flujo laminar. Finalmente, los cultivos fueron incubados en la cámara de cultivo en un agitador orbital a 100 rpm durante 12 días.

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se procedió a filtrar los cultivos fúngicos empleando un matraz kitasato conectado a un sistema de vacío con un embudo Büchner en la parte superior, sobre el que se colocó un papel de filtro. De esta forma se separó la fracción sólida, consistente en el micelio, de la fracción líquida, correspondiente al medio de cultivo. El micelio fue recuperado en el papel de filtro y se determinó tanto su peso fresco, como su peso seco tras ser sometido a un proceso de liofilización. Por otra parte, una vez medido su pH, el extracto acuoso fue sujeto a una extracción líquido-líquido con acetato de etilo en un embudo de decantación. Se añadió el disolvente orgánico y se llevaron a cabo tres ciclos de extracción, obteniéndose al terminar el proceso, por un lado, una fase acuosa (azúcares y componentes solubles en agua) y una fase orgánica de acetato de etilo con los metabolitos secundarios extraídos disueltos en el mismo. Finalmente se añadió sulfato sódico anhidro a la fase orgánica para eliminar los restos de agua que pudiesen quedar y se concentró el disolvente mediante una destilación al vacío utilizando un rotavapor Büchi KRvr 65/45 (Suiza).

Una vez concentrados los extractos, estos fueron disueltos en una pequeña cantidad de acetato de etilo para poder traspasarlos a un vial que había sido previamente pesado con una balanza de precisión. Evaporados los restos del disolvente, los viales fueron nuevamente pesados con la finalidad de determinar el peso seco de los extractos crudos y calcular sus rendimientos (mg/100ml).

Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron empleando cromatofolios de sílica gel de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania) tipo Silica gel 60 F₂₅₄ con indicador fluorescente a 254 nm. Como fase móvil se utilizó una disolución de n-Hexano:Acetato de etilo al 50%. Para la detección de sustancias no coloreadas las placas fueron observadas bajo una lámpara de luz ultravioleta a dos longitudes de onda diferentes: 254 y 360 nm. El revelado de las placas se realizó pulverizando vainillina (mezcla de 10 g de vainillina, 200 ml de metanol y 10 ml de ácido sulfúrico) sobre las mismas.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en los microextractos se realizaron cromatografías líquidas de alta presión (HPLC) en un equipo Beckman Coulter 125P® acoplado a un detector de fotodio modelo 168. Las separaciones se llevaron a cabo en columnas de fase reversa con un tamaño de partícula de 5 µm de sílica Inertsil de 150 mm x 4.6 mm, empleando para ello disolventes de grado HPLC. Los extractos fueron eluidos con MeOH:agua MiliQ al 1% de ácido acético comenzando durante 5 minutos 10:90% y continuando con un gradiente 10:90% durante 50 minutos a un flujo de 0,5mL/min.

Bioensayos de actividad

Antifúngica

La actividad de los extractos obtenidos fue ensayada frente a tres especies de hongos fitopatógenos pertenecientes al filo Ascomycota y conocidos por causar importantes daños y pérdidas en la agricultura: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Botrytis cinerea* Whetzel y *Fusarium oxysporum* Schltdl. Las cepas empleadas procedieron de la colección de hongos del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC (Tenerife, España). Las colonias se cultivaron en placas Petri con medio PDA comercial (Sigma) y se incubaron durante una semana en la cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Para su mantenimiento en condiciones óptimas se realizaron resiembras periódicas.

- *Alternaria alternata* es un hongo patógeno oportunista, perteneciente a la familia Pleosporaceae, ampliamente conocido por causar manchas en las hojas, así como pudriciones y decoloraciones en diversos órganos de las plantas hospedadoras. En

Canarias, es reconocido por ser uno de los principales hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de tomate.

- *Botrytis cinerea* es un hongo necrotrófico, perteneciente a la familia Sclerotiniaceae, que afecta a una gran variedad de especies vegetales, entre ellas importantes cultivos para la economía canaria tales como la vid, el tomate o las fresas. Provoca una enfermedad en las plantas conocida como moho gris, que puede afectar a casi cualquier órgano de las mismas, y que se manifiesta como una podredumbre blanda que le da un aspecto quebradizo y la apariencia de estar empapados de agua a los frutos blandos y hojas afectadas.
- *Fusarium oxysporum* es una especie de hongo, perteneciente al phylum Ascomycota y a la familia Nectriaceae, ampliamente distribuida por todos los tipos de suelo alrededor del mundo. Es considerada como una especie económicamente importante debido a que provoca marchitez vascular y podredumbre en las raíces de varias plantas de interés agrícola. En Canarias, se ha visto que este hongo fitopatógeno afecta a los cultivos predominantes en el archipiélago, constituidos por el plátano, el tomate y la papa.

El ensayo de inhibición del crecimiento micelial se realizó en placas de 12 pocillos (Falcon, Corning, NY, EE. UU.) mediante el método modificado de dilución en agar con la adición de 0,05 mg/mL de sales de metiltetrazolio (MTT). Todos los microextractos fueron disueltos en etanol (EtOH) y ensayados a una concentración de 1 mg/mL e incorporados al medio de cultivo antes de ser vertidos a cada pocillo. Todos los tratamientos se replicaron cuatro veces y se usó EtOH como control negativo. Una vez solidificado el medio, los pocillos fueron inoculados con el patógeno correspondiente empleando sacabocado para obtener un fragmento uniforme del patógeno que fue colocado en el centro. Las placas ensayadas frente a *Botrytis cinerea* fueron incubados en una cámara de cultivo en oscuridad a una temperatura de 26°C; mientras que las ensayadas frente a *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* fueron incubadas en una estufa a 27°C. Después de 48 h de incubación se escanearon las placas, con el objeto de obtener una imagen digitalizada de las colonias fúngicas, y las mediciones del crecimiento micelial se realizaron mediante la aplicación ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). El porcentaje de inhibición (%) se calculó como: $\%I = (C - T / C) \cdot 100$, donde C es el diámetro de las colonias control y T es el diámetro de las colonias ensayadas.

Fitotoxicidad

La fitotoxicidad de los extractos obtenidos fue evaluada mediante el estudio de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular y/o foliar de dos especies vegetales caracterizadas por su alta capacidad germinativa y rápido crecimiento: *Lactuca sativa* L. (lechuga) y *Lolium perenne* L. (ray-grass inglés). La especie *L. sativa* fue seleccionada como modelo de dicotiledóneas por ser un vegetal de interés agrícola y comercial que es, además, habitualmente recomendado emplear en estudios de interacciones alelopáticas (Sobrero y Ronco, 2004). En cambio, *L. perenne* fue seleccionada como modelo de monocotiledóneas por ser una hierba invasiva que compete habitualmente por los recursos con los cultivos, generando pérdidas de rendimiento en los mismos (Fan *et al.*, 2003; Nandula, 2014).

La actividad fitotóxica de los extractos fue valorada frente a semillas de *L. sativa* var. Teresa (Fitó, España) y *L. perenne* (Blumen, Italia). Los experimentos se llevaron a cabo en placas de

cultivo de 12 pocillos (Falcon) siguiendo la metodología descrita a continuación. Utilizando EtOH como disolvente, se preparó una solución por cada extracto con una concentración final de 10 mg/mL. De esta solución, se aplicaron 20 μ L a cada pocillo procurando cubrir de forma homogénea la totalidad del disco de papel de filtro Whatman nº 1 que había sido colocado previamente en el fondo de cada uno. Una vez evaporado el disolvente, se añadieron a cada pocillo 500 μ L de agua destilada y 10 semillas remojadas previamente en agua destilada estéril. Se realizaron 4 repeticiones por cada muestra a evaluar y se estableció tanto un control negativo, con EtOH, como otro positivo, con juglona, un compuesto inhibidor de la germinación. Las placas fueron finalmente selladas con parafilm e incubadas en la cámara de crecimiento de plantas durante 7 días (168 h) a una temperatura de 24°C y bajo un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Durante este periodo de incubación se contabilizó diariamente la germinación de las semillas comenzando a partir de las 72 h para *L. perenne* y de las 24 h para *L. sativa*. Una vez finalizado el ensayo, se seleccionaron 25 plántulas al azar por cada tratamiento y se escanearon para llevar a cabo las mediciones de longitud radicular y foliar en *L. perenne* y de longitud radicular en *L. sativa* haciendo uso del programa ImageJ.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

Aislamiento de hongos endófitos de *N. pulverulenta*

Con la finalidad de estudiar la diversidad endofítica de *N. pulverulenta* se sembraron en dos medios de cultivo sólido diferentes (PDA y MEA) explantos procedentes del tallo y la hoja de un ejemplar silvestre recogido en el Parque Rural de Teno. Las placas se incubaron a 26°C en una cámara de cultivo y, conforme fueron creciendo las colonias de hongos endófitos alrededor de los explantos, se sembraron de forma aislada en un nuevo medio de cultivo para posteriormente realizar su identificación. En total se obtuvieron 142 aislados a partir de los 120 explantos de tejido sembrados pertenecientes a 15 especies diferentes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Número de aislados diferentes hallados para los distintos tejidos vegetales estudiados (tallo y hoja).

HOJA	PDA				MEA			
	SEG. 1	SEG. 2	SEG. 3	SEG. 4	SEG. 1	SEG. 2	SEG. 3	SEG. 4
HOJA 1	2	2	2	2	1	1	1	1
HOJA 2	1	1	1	1	0	1	0	1
HOJA 3	1	2	1	0	2	2	2	2
HOJA 4	0	0	0	0	0	0	1	0
HOJA 5	0*	0*	0*	0*	1	1	1	2
TALLO	PDA				MEA			
	SEG. 1	SEG. 2	SEG. 3	SEG. 4	SEG. 1	SEG. 2	SEG. 3	SEG. 4
TALLO FINO 1	2	3	3	1	1	1	2	1
TALLO FINO 2	1	1	1	3	2	1	3	3
TALLO FINO 3	1	1	1	1	1	1	1	1
TALLO FINO 4	1	1	1	1	1	5	2	2
TALLO FINO 5	2	1	1	0	1	1	1	1
TALLO GRUESO 1	3	1	1	2	1	1	1	1
TALLO GRUESO 2	1	1	1	1	1	3	1	0
TALLO GRUESO 3	1	2	1	1	1	4	1	1
TALLO GRUESO 4	1	1	1	1	1	1	1	1
TALLO GRUESO 5	1	1	0	1	1	1	1	1

En la mayoría de los trabajos enfocados en el estudio de la diversidad endofítica de especies vegetales, la distribución de los hongos endófitos parece estar directamente relacionado con el tejido analizado de la planta hospedadora. Se sabe que los hongos endófitos se distribuyen a través de los diferentes órganos (raíz, tallo, hoja y flor) y tejidos (parénquima, conductos vasculares, dermis, etc.) para así reducir la competencia por los recursos disponibles entre ellos mismos (Giménez *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2016), por lo que, la diversidad obtenida experimentará una gran variación dependiendo del órgano estudiado. En nuestro estudio se analizaron los hongos endófitos del tallo y la hoja, resultando ser el tallo el órgano de la planta que presentó mayor variabilidad endofítica. Así, de este primero se obtuvieron 106 aislados pertenecientes a 13 especies distintas; mientras que en hoja sólo se obtuvieron 36 aislados correspondientes a 3 especies diferentes.

Identificación de los aislados

Con la aplicación de técnicas moleculares basadas en el análisis de las secuencias ITS, se identificaron un total de 15 especies diferentes, todas pertenecientes al filo Ascomycota. En la siguiente tabla se muestra la relación de especies fúngicas aisladas.

Tabla 2. Identificación de los hongos endófitos aislados con sus respectivos datos de identificación molecular, frecuencia relativa (FR), localización en la planta y medio de cultivo usado para su aislamiento.

Código	Especie	Código GenBank	Frecuencia relativa (%)	Órgano	Medio de cultivo
NP1	<i>Alternaria</i> sp.	MT280685.1	7,91	Tallo	PDA/MEA
NP2	<i>Cladosporium aggregatocaticatricatum</i>	NR152300.1	53,96	Tallo, Hoja	PDA/MEA
NP3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MT635286.1	2,16	Tallo	MEA
NP4	<i>Comoclathris</i> sp.	MK460350.1	0,72	Tallo	PDA
NP5	<i>Exophiala mesophila</i>	MH063102.1	0,72	Tallo	PDA
NP6	<i>Foliophoma fallens</i>	KY929148.1	2,88	Tallo	PDA
NP7	Fungal endophyte isolate EUSF00640	OM975398.1	2,88	Hoja	PDA
NP8	<i>Hortaea werneckii</i> strain A401	MH063124.1	1,44	Tallo	MEA
NP9	<i>Hortaea werneckii</i> strain Y. H. Yeh I0122	MK336620.1	17,27	Tallo	PDA/MEA
NP10	<i>Neodevriesia metrosideri</i>	NR161141.1	1,44	Tallo	PDA
NP11	<i>Neodevriesia</i> sp.	KU578112.1	3,60	Tallo	PDA/MEA
NP12	<i>Phialophora</i> sp.	KX347480.1	0,72	Tallo	MEA
NP13	<i>Preussia minima</i>	MN341251.1	0,72	Tallo	PDA
NP14	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	MT232241.1	0,72	Tallo	PDA
NP15	<i>Biscogniauxia</i> sp.	JF773603.1	2,88	Hoja	MEA

Análisis de la diversidad

En base a los resultados obtenidos para el cálculo de las frecuencias relativas podríamos decir que la especie más abundante en la planta (endófito dominante) fue *Cladosporium aggregatocaticatricatum*, la cual demostró un alto grado de representación tanto en el tallo como en la hoja. Esta fue la única especie que pudo ser aislada a partir de ambos órganos vegetales estudiados, presentando el resto de las especies una cierta preferencia por un determinado órgano. Según la bibliografía, esto parece ser un hecho bastante común en los estudios de diversidad endofítica, en los que se ha demostrado que, según el tejido del hospedador analizado, la composición y abundancia de los endófitos varía enormemente (Gamboa-Gaitán, 2006; Huang *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Así, *Hortaea werneckii* strain Y. H. Yeh I012, *Alternaria* sp. (7,91%) y *Neodevriesia* sp. (3,60%) fueron los siguientes endófitos más abundantes, aislados solamente del tallo; seguidos de dos especies, menos abundantes, encontradas únicamente en hoja: Fungal endophyte isolate EUSF00640 (2,88%) y *Biscogniauxia* sp. (2,88%).

Estos datos, en concordancia con artículos publicados anteriormente (Gamboa-Gaitán, 2006), parecerían indicar que la especificidad demostrada por parte de la micoflora por determinados tejidos vegetales podría constituir una ventaja tanto para la planta como para el resto de los endófitos al permitir la coexistencia sobre el mismo individuo vegetal de muchas especies de estos microorganismos, minimizando la competencia entre ellos.

Fermentaciones y preparación de los extractos fúngicos

Con la finalidad de evaluar el potencial como futuros agentes fitosanitarios de los hongos endófitos aislados se realizaron fermentaciones en medio Czapeck y MEB siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de “Material y métodos”. Una vez transcurridos los 12 días de fermentación, el medio de cultivo fue sometido entonces a un proceso de extracción con acetato de etilo, obteniéndose finalmente los microextractos fúngicos (**Tabla 3**).

Los rendimientos que se obtuvieron para el proceso de fermentación fueron muy variables, abarcando un amplio rango: desde 3,5 hasta 80,55 mg por 100 mL de medio de cultivo. Entre todos los microextractos destaca el alto rendimiento obtenido para la cepa NP11 cultivada en Czapeck, de 80,55 mg/100 mL. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos para ambos medios de cultivo empleados para las fermentaciones, se puede apreciar que los valores correspondientes a las fermentaciones en medio MEB fueron menores (3,5 - 16,5 mg/100 ml) en comparación con los obtenidos en medio Czapeck (9,4 - 80,55 mg/100 ml). Otro dato destacable es que, en general, durante las fermentaciones se pudo observar que las cepas de hongos endófitos aisladas en PDA y cultivadas en Czapeck crecieron relativamente más rápido que aquellas que fueron aisladas en MEA y cultivadas en MEB.

En un futuro estos resultados podrán servir como un punto de partida a la hora de establecer las condiciones óptimas de producción iniciales de estos organismos fúngicos, permitiendo de este modo optimizar su fermentación (nutrientes, tiempo de incubación, etc.) para la obtención de los extractos a mayor escala.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Rendimiento de los microextractos fúngicos de endófitos de *N. pulverulenta*. *Las cepas NP1, NP2, NP9 y NP11 se fermentaron en ambos medios al haber sido aisladas tanto en PDA como en MEA.

CEPAS	P. extracto (mg/400 mL)	Rendimiento (mg/100mL)	Peso fresco micelio (g)	Peso seco micelio (g)
NP1 Czapeck	104,7	26,175	20.51	5.69
NP1 MEB*	63	15,75	6.86	2.35
NP2 Czapeck	155,3	38,825	13.62	3.19
NP2 MEB*	65,9	16,475	15.75	2.34
NP3 MEB	16,7	4,175	14.55	3.20
NP4 Czapeck	85	21,25	14.96	3.50
NP5 Czapeck	59,3	14,825	15.19	5.06
NP6 Czapeck	73,4	18,35	15.48	2.96
NP7 Czapeck	59,9	14,975	9.53	1.64
NP8 MEB	16,8	4,2	7.14	3.13
NP9 Czapeck	58,5	14,625	11.47	2.55
NP9 MEB*	17,1	4,275	7.43	2.7
NP10 Czapeck	37,9	9,475	4.24	1.24
NP11 Czapeck	322,2	80,55	47.95	3.47
NP11 MEB*	32,5	8,125	8.12	2.31
NP12 MEB	14,3	3,575	10.90	1.84
NP13 Czapeck	81,3	20,325	9.06	2.27
NP14 Czapeck	128,6	32,15	8.67	2.68
NP15 MEB	90,8	22,7	15.62	2.8

Evaluación de la actividad antifúngica

Con el objeto determinar la actividad fungicida de los microextractos obtenidos se realizaron bioensayos de inhibición del crecimiento micelial utilizando como diana tres especies de hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*; conocidos por causar importantes daños en los cultivos, con sus consecuentes pérdidas económicas.

Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de 12 pocillos mediante el método de dilución en agar con una concentración de microextracto de 1 mg/ml. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (48 h), las colonias fueron digitalizadas y medidas haciendo uso del programa informático ImageJ, siendo los datos resultantes analizados con el programa Microsoft Excel 2013. En este último se llevaron a cabo los cálculos relativos al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para cada bioensayo de acuerdo con la siguiente fórmula: $\%I = (C - T / C) \cdot 100$, donde C es el diámetro de las colonias control y T es el diámetro de las colonias ensayadas.

A continuación, en la **tabla 4** se presentan los resultados de los ensayos de actividad antifúngica de los microextractos frente a los diferentes hongos diana empleados.

Tabla 4. Actividad antifúngica de los microextractos frente a *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. *En las cepas NP1, NP2, NP9 y NP11 se muestran a la izquierda los resultados obtenidos para los microextractos correspondientes a las fermentaciones realizada en medio MEB y, a la derecha, en medio Czapeck.

Extractos	(mg/ml)	Organismos dianas					
		<i>F. oxysporum</i>		<i>A. alternata</i>		<i>B. cinerea</i>	
		% Inhibición		% Inhibición		% Inhibición	
NP1	1	83,44 ± 4,14	0 ± 7,40*	96,72 ± 6,29	37,12 ± 4,34*	85,69 ± 3,68	45,82 ± 6,31*
NP2	1	36,47 ± 4,39	12,99 ± 7,25*	15,77 ± 2,71	35,75 ± 9,28*	33,11 ± 5,07	19,79 ± 10,09*
NP3	1	33,35 ± 7,90		44,17 ± 3,62		41,35 ± 3,96	
NP4	1	0 ± 7,40		37,23 ± 9,71		10,25 ± 10,91	
NP5	1	25,99 ± 8,00		34,88 ± 6,78		21,47 ± 11,01	
NP6	1	31,68 ± 11,07		41,65 ± 3,15		31,94 ± 4,26	
NP7	1	70,96 ± 3,29		41,82 ± 9,46		86,58 ± 3,84	
NP8	1	-3,77 ± 17,57		54,59 ± 6,73		53,28 ± 7,94	
NP9	1	24,39 ± 13,16	37,36 ± 3,16*	52,01 ± 12,67	31,6 ± 7,66	64,12 ± 4,25	41,62 ± 6,97*
NP10	1	10,75 ± 11,09		38,61 ± 2,74		17,57 ± 9,02	
NP11	1	28,81 ± 3,57	19,23 ± 9,24*	47,73 ± 6,49	34,08 ± 2,58	18,18 ± 6,11	16,85 ± 9,80*
NP12	1	13,7 ± 4,40		48,83 ± 8,36		31,63 ± 9,78	
NP13	1	34,55 ± 6,61		39,32 ± 15,62		42,52 ± 19,51	
NP14	1	35,87 ± 6,23		50,54 ± 8,11		27,63 ± 1,81	
NP15	1	22,2 ± 4,87		19,23 ± 2,74		29,15 ± 2,28	

A nivel general, los resultados obtenidos parecen demostrar que *A. alternata* fue la diana más sensible, viéndose afectado su crecimiento moderadamente por un 50% de los extractos. Por el

contrario, *F. oxysporum* tan solo vio reducido su crecimiento significativamente con la aplicación de dos extractos.

El extracto que presentó mayor actividad fungicida frente a todas las dianas ensayadas fue el del hongo endófito NP1 cultivado en medio MEB. Este extracto demostró tener una potente actividad, obteniéndose para todos los casos unos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 80%: *A. alternata* (96,72%), *F. oxysporum* (83,44%) y *B. cinerea* (85,69%). Asimismo, aunque en menor medida, el extracto de NP7 cultivado en Czapeck también demostró ser activo frente a todas las dianas, inhibiendo el crecimiento de *B. cinerea* y *F. oxysporum* en un 86,58 y 70,96% respectivamente; mientras que, para *A. alternata* la actividad fungicida demostrada fue moderada (41,82%).

En esta misma línea, los extractos de NP3, NP8 y NP9 demostraron tener también actividad antifúngica moderada (40-60%) frente el crecimiento de *A. alternata* y *B. cinerea*.

Por otro lado, se obtuvieron extractos que presentaron una actividad fungicida específica frente al crecimiento de solamente uno de los hongos diana ensayados. Este es el caso de los extractos de NP11 y N12 cultivados en MEB y de NP6 y NP14 cultivados en Czapeck, que inhibieron moderadamente el crecimiento de *A. alternata*.

La producción de metabolitos secundarios en medios de cultivo líquidos por parte de hongos filamentosos es muy sensible a factores abióticos tales como la temperatura, la humedad, el pH, los nutrientes y el tiempo de incubación. En este estudio hemos podido observar como el extracto más activo, correspondiente al hongo endófito NP1 cultivado en MEB, presentó una potente actividad antifúngica frente a todas las dianas; mientras que, cuando este mismo hongo fue fermentado en Czapeck, su extracto sólo mostró un efecto moderado frente a *A. alternata* y *B. cinerea*. En el perfil metabolómico por HPLC-DAD se observan diferencias cualitativas y cuantitativas entre los componentes presentes en ambos extractos, lo cual podría estar relacionado con su actividad (**Figura 1**).

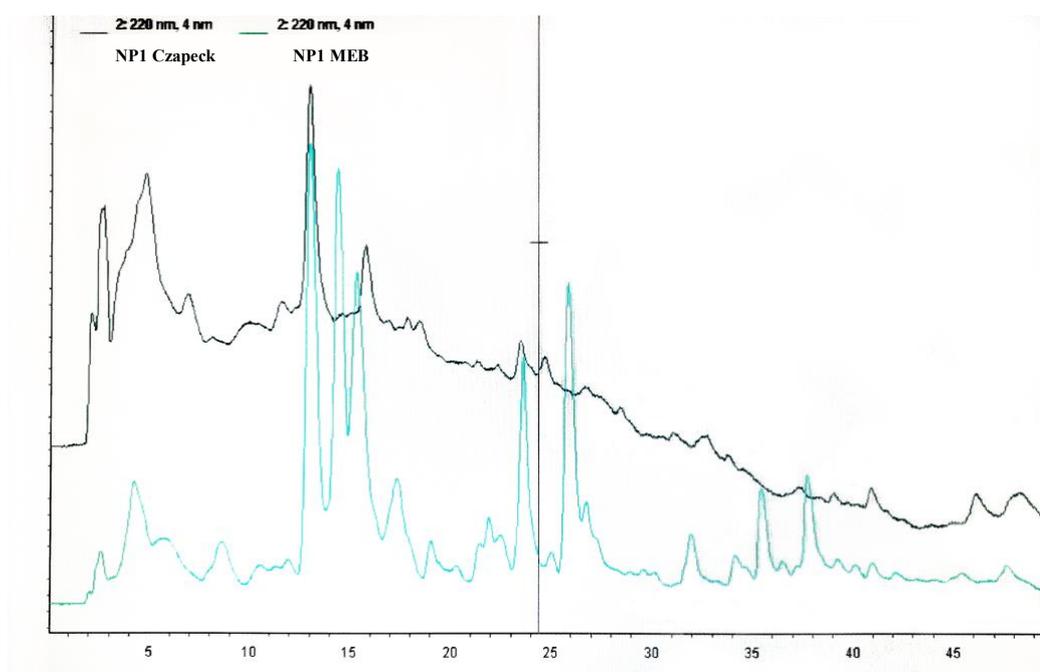


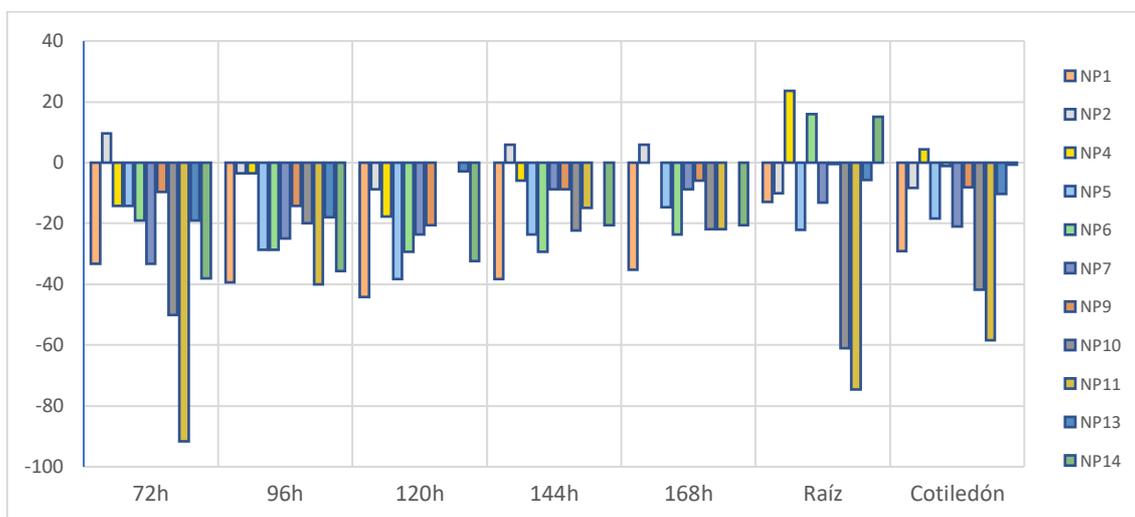
Figura 3. Perfiles metabolómicos de los extractos obtenidos a partir de las fermentaciones del hongo endófito NP1 (*Alternaria sp.*) en medio Czapeck (negro) y MEB (azul).

Evaluación de la actividad fitotóxica

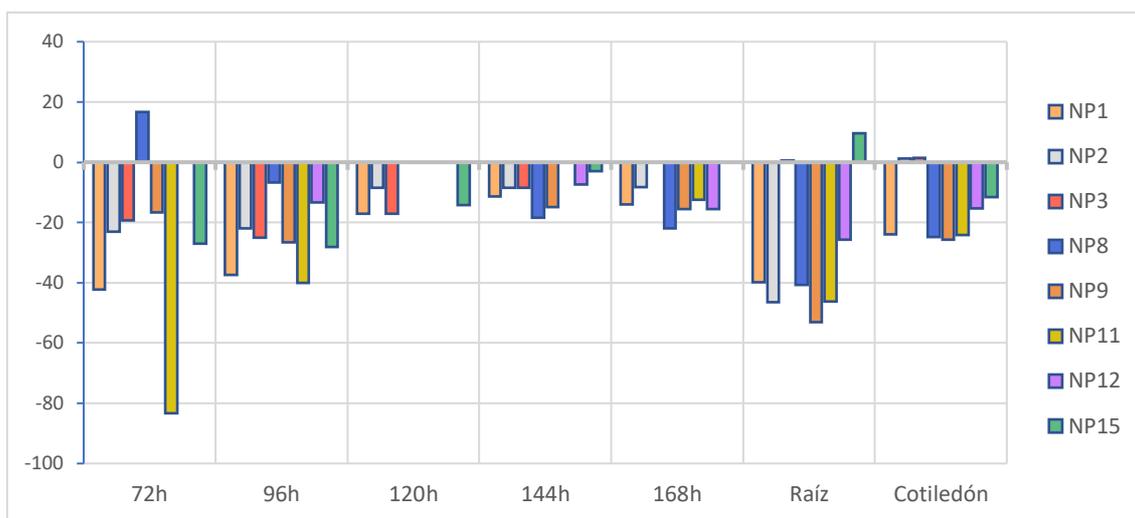
Con la finalidad de averiguar si alguno de los microextractos fúngicos obtenidos pudiese tener aplicaciones como herbicida, así como para determinar si aquellos que demostraron tener actividad antifúngica podrían ver comprometida su aplicación como futuros agentes de control de plagas al producir efectos negativos sobre los cultivos, se realizaron ensayos de actividad fitotóxica.

La fitotoxicidad de los microextractos fue evaluada frente a semillas de *Lactuca sativa* (dicotiledónea) y *Lolium perenne* (monocotiledónea) a una concentración de 0,4 mg/ml. A lo largo del ensayo se contabilizó diariamente la germinación de las semillas y, una vez que este finalizó, se procedió a medir la longitud radicular y foliar de las plántulas con el programa informático ImageJ. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Microsoft Excel 2013. Para todos ellos se calculó el promedio, la desviación estándar, la desviación típica, el porcentaje relativo y el porcentaje absoluto.

Los resultados de los ensayos de fitotoxicidad realizados con *L. perenne* y *L. sativa* para los diferentes microextractos fúngicos no siguieron el mismo patrón de agrupación observado para los efectos antifúngicos. En las gráficas que se presentan a continuación se recoge la fitotoxicidad obtenida para los diferentes microextractos de hongos endófitos ensayados en función del medio en el que fueron fermentados (Czapeck o MEB) y el organismo diana empleado (*L. sativa* o *L. perenne*).



Gráfica 1. Actividad fitotóxica de los microextractos de hongos endófitos fermentados en medio Czapeck sobre la germinación y longitud radicular y foliar de *L. perenne*. Los datos se encuentran expresados en % relativos.



Gráfica 2. Actividad fitotóxica de los microextractos de hongos endófitos fermentados en medio MEB sobre la germinación y longitud radicular y foliar de *L. perenne*. Los datos se encuentran expresados en % relativos.

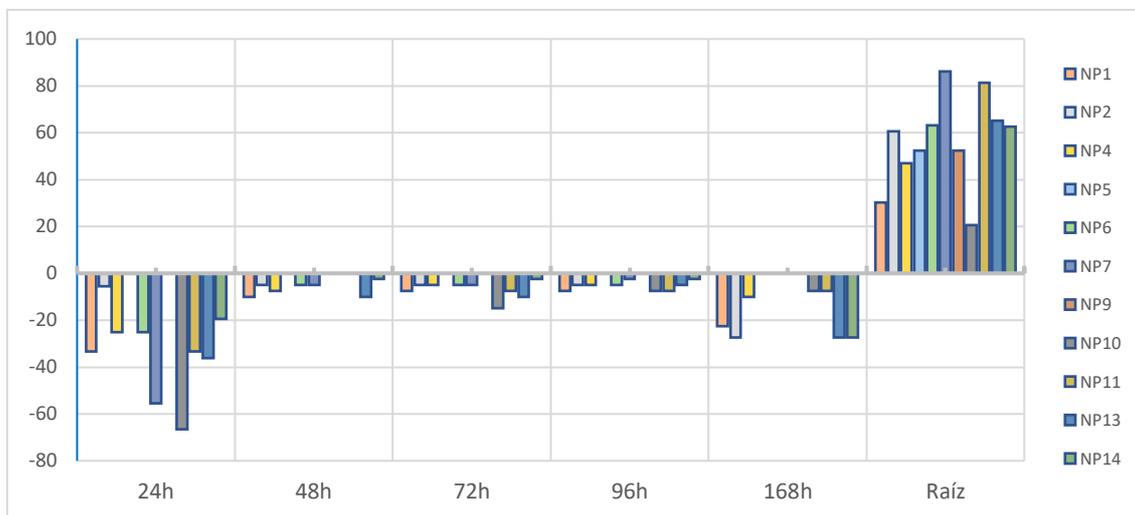
En general, ninguno de los microextractos de hongos endófitos cultivados en medio Czapeck redujo significativamente la germinación de *L. perenne* a las 72 horas de iniciarse el ensayo. La única excepción la constituyó el extracto de NP11, que inhibió en un inicio la germinación de esta monocotiledónea en más de un 90%. Sin embargo, este efecto experimentó una drástica reducción a partir de las 96 h que se mantuvo hasta al finalizar el experimento, de forma que, a las 168 horas, este tan solo presentaba una diferencia del 20% con respecto al control. Por otro lado, el extracto de NP10 también demostró tener un efecto fitotóxico sobre la germinación a las 72 horas, aunque en este caso moderado (50%), que igualmente terminó por desaparecer antes de finalizar el ensayo. Estos dos extractos que demostraron tener algún efecto sobre la germinación mostraron también efectos fitotóxicos sobre el crecimiento radicular y foliar de esta especie. Así, los extractos de NP10 y NP11 redujeron en un 70 y 90% el crecimiento de la raíz con respecto al control, al mismo tiempo que afectaron de forma moderada (40-60%) a la longitud foliar de esta especie.

En los microextractos de hongos endófitos fermentados en medio MEB se observaron efectos similares frente a *L. perenne* a los obtenidos para los cultivados en Czapeck. En este caso, el extracto de NP11 también demostró tener un efecto fitotóxico inicial sobre la germinación de las semillas que acabó desapareciendo a las 168 horas. Los extractos de NP1, NP2, NP8, NP9 y NP11 inhibieron también de forma moderada (40-50%) la elongación radicular en esta planta.

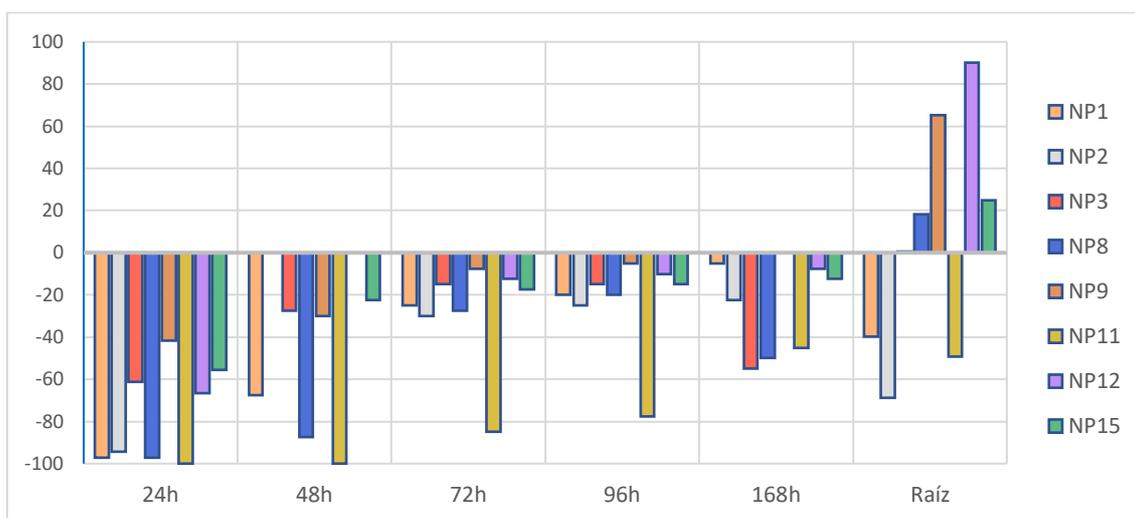
Los efectos fitotóxicos frente a monocotiledóneas demostrados por los extractos de NP10 y NP11 fermentados en Czapeck convierte a estos dos hongos en potenciales candidatos para la obtención de bioherbicidas.

Diversos estudios han demostrado que los hongos endófitos son capaces de producir extractos fitotóxicos que podrían ser desarrollados para su futura utilización como bioherbicidas. En 2020, por ejemplo, se publicó un artículo en el que se observaba como los filtrados de hongos endófitos de *Parthenium hysterophorus* L., especialmente el de *Alternaria* spp., exhibían fuertes efectos fitotóxicos, causando una reducción significativa en los parámetros de germinación y de crecimiento, frente a las tres especies herbáceas ensayadas: *Chenopodium album* L., *Avena fatua* L. y *Convolvulus arvensis* L. (Ahmad et al., 2020). Asimismo, en otro estudio publicado en ese mismo año, se demostró que los extractos metanólicos de tres hongos endófitos (*Diaporthe*

phaseolorum (Cooke & Ellis) Sacc., *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom y *Trichoderma spirale* Bissett) interferirían en el correcto funcionamiento del aparato fotosintético de *Senna occidentalis* (L.) Link y *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell, dos hierbas comúnmente presentes en los cultivos de soja y arroz, induciendo una disminución del desarrollo de sus tallos (Moura *et al.*, 2020).



Gráfica 3. Actividad fitotóxica de los microextractos de hongos endófitos fermentados en medio Czapeck sobre la germinación y longitud radicular y foliar de *L. sativa*. Los datos se encuentran expresados en % relativos.



Gráfica 4. Actividad fitotóxica de los microextractos de hongos endófitos fermentados en medio MEB sobre la germinación y longitud radicular y foliar de *L. sativa*. Los datos se encuentran expresados en % relativos.

Ninguno de los microextractos fúngicos obtenidos en medio Czapeck obtuvo valores lo suficientemente significativos como para indicar la tenencia de un efecto fitotóxico sobre el crecimiento y la germinación de *L. sativa*. Solamente los extractos de NP7 y NP10 demostraron tener un efecto inhibitorio moderado sobre la germinación a las 24 horas, que desapareció una vez cumplidas las 48 horas. En cambio, se observó que la mayoría de los microextractos exhibieron un efecto alelopático positivo sobre el crecimiento radicular de esta especie de dicotiledónea. Así, la aplicación de los extractos tuvo, en general, un moderado efecto estimulador de la elongación radicular con respecto al control que fue, además, más

pronunciado para los extractos de NP7 y NP11, para los que se obtuvieron cifras superiores al 80%.

Por el contrario, casi todos los microextractos de endófitos fermentados en MEB demostraron tener un potente efecto fitotóxico sobre la germinación de *L. sativa* a las 24 horas, obteniéndose valores cercanos al 100% de inhibición para muchos de ellos: NP11 (100%), NP1 (97%), NP8 (97%) y NP2 (94%). Sin embargo, esta actividad desapareció casi por completo al finalizar el experimento. Sólo los extractos de NP3, NP8 y NP11 que, a las 168 horas, seguían exhibiendo un efecto inhibitorio moderado (50%) sobre la germinación de esta especie. En lo que respecta al efecto fitotóxico sobre el crecimiento radicular, los extractos de NP11 y NP2 inhibieron en un 50 y un 70% respectivamente el crecimiento de este órgano vegetal. Por el contrario, los extractos de NP9 y NP12 se observó que promovieron significativamente la elongación radicular, siendo este efecto alelopático más pronunciado con el extracto de NP12 (90%).

La alelopatía positiva exhibida por parte de los extractos de NP9 y, especialmente, NP12 podría indicar una futura aplicación de los mismos como bioestimulantes.

Es conocido que los organismos endófitos producen varias fitohormonas tales como auxinas, ácido abscísico, citoquininas, etileno o ácido giberélico, que ayudan a promover el crecimiento de la planta huésped (Mishra *et al.*, 2021). En estudios anteriores se ha corroborado la producción por parte de algunos endófitos de reguladores del crecimiento de las plantas que afectan concretamente a la arquitectura de la raíz, modificando su fisiología y función. Una mayor longitud radicular o un mayor grosor, así como una ramificación más abundante son algunos de los efectos que ha sido descritos como consecuencia directa de la colonización de endófitos. Estas características, que confieren una mayor área de superficie radicular, permiten en última instancia mejorar la solubilización de nutrientes la eficiencia de absorción de tanto agua como solutos, contribuyendo positivamente en la aptitud demostrada por la planta (Verma *et. al*, 2021).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La especie endémica *Neochamaelea pulverulenta* presenta un ecosistema relativamente rico en especies fúngicas endofíticas con una distribución espacial desigual en la planta huésped. El estudio de la biodiversidad endofítica de *N. pulverulenta* llevó a la conclusión de que la distribución de las especies fúngicas se encuentra en gran medida influenciada por el órgano vegetal estudiado. Para esta especie, el tallo fue el órgano que presentó una mayor biodiversidad, consiguiéndose aislar un total de 13 especies fúngicas diferentes.
2. Los rendimientos que se obtuvieron durante el proceso de fermentación fueron muy variables y no se apreció ninguna diferencia significativa entre los valores obtenidos para ambos medios de cultivo empleados. Sin embargo, si se pudo apreciar las cepas de hongos endófitos aisladas en PDA y cultivadas en Czapeck crecieron relativamente más rápido que aquellas que fueron aisladas en MEA y cultivadas en MEB.
3. Los ensayos de actividad antifúngica realizados con los microextractos de hongos endófitos permitieron seleccionar a dos especies, NP1 (*Alternaria sp.*) y NP7 (Fungal endophyte isolate EUSF00640), como potenciales agentes de control fitosanitario contra hongos fitopatógenos. El primero de ellos demostró tener una potente actividad frente a las tres dianas ensayadas (*F. oxysporum*, *A. alternata* y *B. cinerea*); mientras que el segundo fue muy activo frente a sólo dos de ellos (*F. oxysporum* y *B. cinerea*).
4. Los resultados obtenidos para los estudios de actividad fitotóxica frente a mono y dicotiledóneas de los microextractos fúngicos obtenidos siguió un patrón diferente al observado en los bioensayos antifúngicos. Así, ninguno de los extractos con actividad fungicida demostró tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *L. perenne* ni *L. sativa*. En cambio, se descubrieron dos especies, NP11 (*Neodevriesia sp.*) y NP10 (*Neodevriesia metrosideri*), con un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *L. perenne*, indicando una potencial aplicación de los mismos como herbicidas selectivos frente a monocotiledóneas. Por otro lado, los extractos de NP7 (Fungal endophyte isolate EUSF00640), NP9 (*Hortaea werneckii* strain Y. H. Yeh I0122), NP11 (*Neodevriesia sp.*) y NP12 (*Phialophora sp.*) estimularon el crecimiento radicular de *L. sativa*, pudiendo ser aplicados como bioestimulantes a los cultivos.
5. Finalmente, se debe tener en cuenta que este estudio se basó en los datos obtenidos a partir de la realización de un único muestreo, por lo que los resultados y conclusiones a las que se han llegado en el mismo podrían experimentar variaciones de cara a la realización de futuros trabajos. No obstante, ha permitido ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad y posibles aplicaciones futuras de los hongos endófitos presentes en la especie *Neochamaelea pulverulenta*, uno de los muchos endemismos presentes en las Islas Canarias.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Ahmad, Y., Ahmad, M.N., Zia, A. et al. Biocontrol of economically important weed species through endophytic fungi isolated from *Parthenium hysterophorus* (Family: Asteraceae). *Egypt J Biol Pest Control* 30, 138 (2020). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00339-5>
- Altieri, M. A. (1999). *Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable*. Editorial Nordan-Comunidad. <http://agroeco.org/wp-content/uploads/2010/10/Libro-Agroecologia.pdf>
- Arenal, F., Platas, G., Monte, E. y Peláez, F. (2000). ITS sequencing support for *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* being the same biological species. *Mycol. Res.*, 104(3), 301–303. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001537>
- Damin, V. y Trivelin, P. (2011). *Herbicides effect on nitrogen cycling in agroecosystems*. IntechOpen.
- Dhayanithy, G., Subban, K. & Chelliah, J. (2019). Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. *BMC Microbiol*, 19(22). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1386-x>
- FAO, FIDA, OMS, PMA y UNICEF. (2020). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2020. Transformación de los sistemas alimentarios para que promuevan dietas asequibles y saludables*. Roma: FAO.
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N. y Matambo, T. (2021). Biopesticides in Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed by Green Chemistry Principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5:619058. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>
- Gamboa-Gaitán M. A. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta biol. Colomb.*, 11, suppl. 1.
- Ghimire, S. R., Charlton, N. D., Bell, J. D., Krishnamurthy, Y. L. y Craven, K. D. (2011). Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity*, 47, 19-27. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0085-6>
- Giménez, C., Cabrera, R., Reina, M. y González-Coloma, A. (2007). Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection. *Current Organic Chemistry* 11(8), 707 – 720. <https://dx.doi.org/10.2174/138527207780598765>
- González, A. G., Fraga, B. M. y Pino, O. (1977). Cromonas minoritarias de la “*Neochamaelea pulverulenta*” Erndt. *Anales de Química* 73, 557 – 560.
- Grabka, R., d’Entremont, T.W., Adams, S.J., Walker, A.K., Tanney, J.B., Abbasi, P.A. y Ali, S. (2022). Fungal Endophytes and Their Role in Agricultural Plant Protection against Pests and Pathogens. *Plants* 11, 384. <https://doi.org/10.3390/plants11030384>
- Grumezescu, A. M. (2017). *New pesticides and soil sensors*. ProQuest Ebook Central. Elsevier Science & Technology.
- Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mäder P, Widmer F (2015) Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J* 9(5):1177–1194.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H. y Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33, 61–75.
- Kusari, S., Hertweck, C. y Spiteller, M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology* 19(7), 792 – 798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>
- Malik, Z., Ahmad, M., Abassi, G.H., Dawood, M., Hussain, A., Jamil, M. (2017). Agrochemicals and soil microbes: interaction for soil health. En M. Hashmi, V. Kumar y A. Varma (Eds.) *Xenobiotics in the soil environment* (139 – 152). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2_11
- Mishra, A., Gond, S. K., Kumar, A., Sharma, V. K., Verma, S. K., Kharwar, R. N., & Sieber, T. N. (2012). Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. *Microbial ecology*, 64(2), 388–398. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0029-7>
- Mishra, D., Kumar, A., Tripathi, S., Chitara, M. K. y Chaturvedi, P. (2021). Endophytic fungi as biostimulants: An efficient tool for plant growth promotion under biotic and abiotic stress conditions. En S.

- Gupta y J. Van Staden (Eds.), *Biostimulants for crops from seed germination to plant development* (pp. 365-391) Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00019-8>
- Mondon, A., Epe, B. (1983). Bitter Principles of Cneoraceae. En A. D. Kinghorn, H. Falk y J. Kobayashi (Eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 44. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8714-2_2
- Morales-Sánchez, V., Díaz, C. E., Trujillo, E., Olmeda, S. A., Valcarcel, F., Muñoz, R., Andrés, M.F. y González-Coloma, A. (2021). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. SPH2. *J. Fungi* 7(2), 109. <https://doi.org/10.3390/jof7020109>
- Moura, M. S., Lacerda, J. W. F., Siqueira, K. A., Bellete, B. S., Sousa Jr, P. T., Dall'Óglio, E. L., Soares, M. A., Vieira, L. C. C. y Sampaio, O. M. (2020) Endophytic fungal extracts: evaluation as photosynthesis and weed growth inhibitors. *Journal of Environmental Science and Health*, 55(5), 470-476. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1721981>
- Mousa, W. K. y Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Front. Microbiol.* 4(65). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00065>
- Nandula, K. V. (2014). Italian Ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) and Corn (*Zea mays*) Competition. *American Journal of Plant Sciences* 5(26), 3914–3924. 10.4236/ajps.2014.526410
- Nicholls, C. I., Altieri, M. A. y Vázquez, L. L. (2015). Agroecología: Principios para la conversión y el rediseño de sistemas agrícolas. *Agroecología* 10(1), 61-72.
- Nischitha, R. y Shivanna, M. B. (2020). Influence of seasons on endophytic fungal assemblage in *Alloteropsis cimicina* (L.) Stapf. and *Heteropogon contortus* (L.) P. Beauv. of the sub-family panicoidae. *Journal of Fungal Biology*, 10(1), 10 – 25. 10.5943/cream/10/1/2
- ONU. (2021). *Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Nueva York: Servicio de Publicaciones de las Naciones Unidas.
- Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Edgar Dantán-González, E. y Castrejón-Godínez, M. L. (2013). Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. En R. Chamy y F. Rosenkranz (Eds.), *Biodegradation - Life of Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/56098>
- Oviedo, R., Traveset, A., Valido, A. y Brull, G. (2009). Sobre la presencia de *Cneorum* (Cneoraceae) en Cuba: ¿ejemplo de disyunción biogeográfica Mediterráneo-Caribe? *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66(1), 25-33. <http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2197>
- Pérez de Paz, J., Febles Hernández, R., Fernández-Palacios, O. y Olangua Corral, M. (2013). Evolución y vías de acceso a la dioecia en la Flora Canaria: *Neochamaelea pulverulenta* (Cneoraceae) un ejemplo desde heterodigamia y androdioecia. *VIERAEA* 41, 269–292.
- Pérez-Méndez, N., Jordano, P. y Valido, A. (2015). Downsized mutualisms: Consequences of seed dispersers' body-size reduction for early plant recruitment. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17, 151 – 159. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2014.12.001>
- Pérez-Méndez, N., Jordano, P. y Valido, A. (2018). Persisting in defaunated landscapes: Reduced plant population connectivity after seed dispersal collapse. *J Ecol.* 106, 936 – 947. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12848>
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Cabello, M. N., Stenglein, S. A., Vianna, M. F. y Scorsetta, A. C. (2016). Endophytic fungi from selected varieties of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and corn (*Zea mays* L.) grown in an agricultural area of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.11.006>
- Sethi, S., Dhakad, S. y Arora, S. (2022). The Use of Biopesticides for Sustainable Farming: Way Forward toward Sustainable Development Goals (SDGs). En S. Arora, A. Kumar, S. Ogita y Y. Y. Yau (Eds.) *Biotechnological Innovations for Environmental Bioremediation*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9001-3_24
- Singh, N. K., Dhar, D. W. y Tabassum, R. (2016). Role of cyanobacteria in crop protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India. Section B: Biological Sciences*, 86(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0445-1>
- Sobrero M.C. y Ronco A. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantó (Eds.) *Ensayos toxicológicos para la evaluación de*

- sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (pp. 55–68). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- Tawfike, A. F., Tate, R., Abbott, G., Young, L., Viegelmann, C., Schumacher, M., Han, B.W. y Edrada-Ebel, R. (2017). Metabolomic Tools to Assess the Chemistry and Bioactivity of Endophytic *Aspergillus* Strain. *Chemistry and Biodiversity* 14, e1700040. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700040>
- Toth, G y Szigeti, C. (2016). The historical ecological footprint: From over-population to over-consumption. *Ecological Indicators*, 60, 283-291. [10.1016/j.ecolind.2015.06.040](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.040)
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019. <https://population.un.org/wpp/>
- United States Environmental Protection Agency (EPA) (10 de Octubre de 2022). *Biopesticides*. <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>
- Verma, S., Sahu, P., Kumar, K., Pal, G., Gond, S., Kharwar, R. and White, J. (2021), Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance. *J. Appl. Microbiol.*, 131: 2161-2177. <https://doi.org/10.1111/jam.15111>
- Vieira Costa, J. A., Bastos Freitas, B. C., Gonzales Cruz, C., Greque Morais, J. S. y M. (2019). Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(5), 366- 375. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1571366>
- Yuan, Z. L., Zhang, C. L., Lin, F. C., & Kubicek, C. P. (2010). Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and environmental microbiology*, 76(5), 1642–1652. <https://doi.org/10.1128/AEM.01911-09>
- Zhang, Q., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D., Chen, W. y Li, G. (2014). Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*, 72, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.018>