

ULL

Universidad
de La Laguna



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

**Departamento de Botánica, Ecología y
Fisiología Vegetal de la Facultad de
Ciencias, Sección Biología**

**Endophyte biodiversity vegetables species and
their potential biopesticide**

**Biodiversidad de hongos endófitos de especies
vegetales y su potencial bioplaguicida**

Trabajo Fin de Grado

JENNIFER RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Septiembre, 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

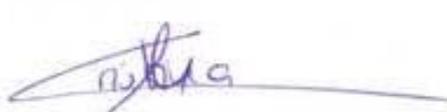
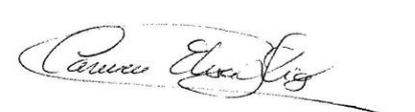
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
43836486G	Jennifer Rodríguez Hernández
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
699610900	alu0100698558@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

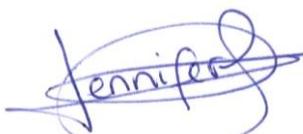
Biodiversidad de hongos endófitos de especies vegetales y su potencial bioplaguicida
--

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

Dña. Cristina Giménez Mariño	
Profesora del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal	
y Dña. Carmen Elisa Diaz Hernández	
Investigadora del Departamento de Biotecnología y Química de Productos Naturales del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC).	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
	
Fdo: Cristina Giménez Mariño	Fdo.:Carmen Elisa Diaz Hernandez

La Laguna, a 1 de septiembre de 2015

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades sobre hongos endófitos	1
1.2. Bioplaguicidas fúngicos.....	3
1.3. Flora endémica de Canarias	4
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
3.1. Hongos endófitos.....	5
3.2. Hongos fitopatógenos.....	5
3.3. Obtención de los extractos fúngicos de endófitos.....	8
3.3.1. Cultivo en medio sólido.....	8
3.3.2. Preparación del medio de cultivo líquido.....	9
3.3.3. Preparación de preinóculos.....	10
3.3.4. Fermentación en medio líquido.....	10
3.3.5. Extracción del medio de cultivo.....	11
3.3.6. Concentración del solvente de las extracciones.....	12
3.4. Bioensayos de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos.....	13
3.4.1. Cultivo de hongos fitopatógenos.....	13
3.4.2. Preparación del medio de cultivo de los ensayos.....	13
3.4.3. Siembra de los fitopatógenos diana.....	14
3.4.4. Análisis de datos.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Obtención biotecnológica de extractos de hongos endófitos.....	16
4.2. Bioensayos de actividad antifúngica de los extractos de hongos endófitos.....	17
5. CONCLUSIONES.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26

Biodiversidad de hongos endófitos de especies vegetales y su potencial bioplaguicida

Resumen:

En el presente trabajo se investiga el potencial fungicida de 21 cepas de hongos endófitos aisladas de especies vegetales endémicas de Canarias, las cuales ya habían mostrado previamente actividad plaguicida relevante frente a otras dianas biológicas (insectos, nematodos,...)

Los hongos endófitos se fermentaron en medio líquido para obtener sus extractos crudos y realizar los bioensayos de inhibición del crecimiento en placa a diferentes concentraciones de extracto. Las dianas empleadas fueron las especies de hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Geotrichum sp* y *Phoma sp.*, causantes cada año de importantes pérdidas en numerosos cultivos a nivel mundial.

La actividad biológica de los diferentes extractos se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico y la EC50 y sus límites de confianza, obteniéndose como resultado final unos valores de actividad que ponen de manifiesto la importancia de los hongos endófitos como fuente potencial de productos naturales activos para el control de plagas y enfermedades agrícolas.

Palabras claves: Hongos endófitos - productos naturales - bioactividad - endemismos vegetales canarios - hongos fitopatógenos.

Endophyte biodiversity vegetables species and their potential biopesticide

Summary:

In this work 21 strains of fungal endophytes isolated from Canarian endemic flora were studied to determinate their potencial fungicide. These organisms had previously shown high activity against other biological targets (insects, nematodes, ...).

The endophytes were fermented in liquid medium to obtain their crude extracts. Then bioassays of growth inhibition in petri dishes were tested in different concentrations of extracts. The targets used were phytopathogenic fungi that cause each year important losses in agriculture worldwide: *Botrytis cinerea*, *Alternaria*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Phoma sp.* and *Geotrichum sp.*

The biological activity of the different extracts was evaluated by calculating the percentage inhibition of fungal growth, and the EC50 and confidence limits. A large number of the tested extracts showed high antifungal activity. Results obtained showed the importance of endophytes as a potential source of natural products active for the control of agricultural pests and diseases.

Keywords: Fungal endophytes - natural products - bioactivity - canarian endemic plants - phytopathogenic fungi.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los hongos endófitos

Los hongos endófitos son microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de las plantas, sin causar daño o síntomas aparentes de enfermedad sobre su huésped (Kusari et al., 2012). Se localizan en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales (Strobel y Daisy, 2003) como en el interior de las células (simplasto). La mayoría de los hongos endófitos se transmiten horizontalmente, mediante la producción de esporas externas y su dispersión en el aire infectando otras plantas, y menos frecuentemente, a través de semillas infectadas a otras generaciones de plantas por una transmisión vertical.

Para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una interacción de antagonismo, que permite la supervivencia de ambos organismos, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, y que se encuentran influenciadas por los factores ambientales y la etapa de desarrollo de ambos organismos (Sánchez et al., 2013).

En el beneficio de esta asociación, la planta protege y proporciona nutrientes al endófito para que éste complete su ciclo de vida, y por otro lado el endófito produce fitohormonas que aumenta el desarrollo de la planta huésped y productos naturales que juegan un papel importante en su defensa (Gunatilaka et al., 2006).

Como consecuencia de esta interacción endófito-planta, se ha observado una diversidad de efectos que mejoran la adaptación ecológica de la planta al ecosistema en el que habita al aumentar su tolerancia al stress, a cambios de temperatura y salinidad, y su resistencia frente a enfermedades, herbívoros, insectos, nemátodos, bacterias y hongos patógenos (Kaul et al., 2012)

La existencia de hongos endófitos dentro de órganos de plantas se conoce desde el siglo XIX y el término “endófito” fue propuesto por primera vez por Bary en 1896 (Bary et al., 1866) para referirse a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas. Actualmente este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos (Rodríguez et al., 2009, Tan et al., 2001), que viven asintómicamente dentro de tejidos vegetales.

Los hongos endófitos representan uno de los grupos importantes de la biodiversidad microbiana. Se han aislado de diferentes órganos de las plantas y un diverso rango de huéspedes, incluyendo algas, briofitos, pteridofitos, gimnospermas y angiospermas. La

mayoría pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Rosa et al., 2011).

Colonizan plantas en diferentes hábitats, desde especies que viven en el Ártico y ambientes xéricos hasta bosques templados y tropicales. Se estima que cada una de las 300.000 especies de plantas que existen en el planeta es huésped de uno o varios endófitos, y de todos los ecosistemas terrestres, los bosques templados y tropicales parecen albergar una mayor cantidad de estos hongos (Mittermeier et al., 1999).

Aunque el primer descubrimiento de un hongo endófito se realizó en 1904, este grupo de microorganismos no recibió demasiada atención hasta que se puso de manifiesto su papel ecológico y su potencial para producir metabolitos secundarios, muchos de ellos con nuevas estructuras químicas (alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glucósidos, lignanos, lactonas, etc) con un amplio rango de actividades biológicas (antifúngica, antibiótica, insecticida, anticancerígena, antioxidante (Chowdhary et al., 2012).

A medida que se han ido descubriendo nuevos productos naturales, el interés por los hongos endófitos ha ido en aumento, ya que estos microorganismos pueden convertirse en una fuente sostenible de dichos compuestos. La producción a gran escala de metabolitos secundarios a partir microorganismos es más fácil y económica que su obtención por otros métodos o a partir de otras fuentes que los produzcan, de ahí el interés de explorar los endófitos, tanto por la diversidad química y biológica que cabe esperar como por el número de especies que podrían quedar por descubrir.

Las principales ventajas que presenta la producción biotecnológica (Khawar et al., 2011) de productos naturales de microorganismos son:

1. Los microorganismos se pueden conservar indefinidamente, asegurando de esta forma su disponibilidad.
2. Su producción es sostenible al mantenerse indefinidamente en sistemas de cultivo, bajo condiciones controladas, y es posible aumentar su productividad mediante la optimización de las condiciones de cultivo.
3. Se pueden producir diferentes compuestos modificando las condiciones de cultivo. Estos cambios se pueden realizar como un método de optimización de varias rutas biosintéticas, y producir derivados de un compuesto bioactivo.
4. La inserción de genes y otras técnicas moleculares se podrían emplear para regular la producción de un compuesto específico o generar análogos estructurales.

5. Finalmente, los microorganismos se pueden cultivar a gran escala en fermentadores (biorreactores), que permiten la producción a nivel industrial de sus metabolitos.

1.2. Bioplaguicidas fúngicos

El control racional de las enfermedades producidas por hongos sobre los cultivos es uno de los mayores problemas con los que se encuentra la industria alimentaria. La diversidad de especies de hongos, su gran adaptabilidad a condiciones extremas y su capacidad para desarrollar resistencia hacen de estas enfermedades unas de las más temidas por los agricultores.

Con la llegada de los insecticidas de síntesis en la década de los cincuenta, y, posteriormente, de los fungicidas, se alcanzó un control eficiente de un gran número de plagas agrícolas. Esta mejora en las condiciones sanitarias de los cultivos ha sido uno de los factores que ha permitido un crecimiento en la producción de cereales, frutas y hortalizas, con una repercusión importante en la alimentación humana y en la sanidad de los alimentos.

El principal método en el control de las enfermedades fúngicas en los países industrializados se ha basado en el uso intensivo de fungicidas sintéticos. Sin embargo, en la última década tanto en Europa como en los Estados Unidos, las normas sobre la utilización de fungicidas sintéticos son más estrictas debido a la aparición de daños al medio ambiente y a la salud humana, la aparición de plagas secundarias o incluso el desarrollo de resistencias hereditarias. También existen reglamentos más estrictos en cuanto al Límite Máximo de Residuos (LMR) de plaguicidas, marcando como máximo un 0,01 mg/kg en alimentos y haciendo necesario el empleo de alternativas a los productos químicos.

La aparición de cepas patogénicas resistentes, con el consiguiente incremento de las dosis de fungicidas, y las legislaciones cada vez más restrictivas para la aprobación de nuevos fitosanitarios y su uso en los cultivos, hace necesario la búsqueda de nuevos métodos de control de plagas y enfermedades de cultivos que garanticen la seguridad alimentaria y minimicen estos efectos negativos.

En este sentido los endófitos suponen una fuente de productos naturales muy interesante para su aplicación como bioplaguicidas fúngicos en la agricultura, teniendo en cuenta el papel que desempeñan en los mecanismos de defensa de la planta huésped (Gimenez et al, 2007).

1.3. Flora endémica de Canarias

La flora canaria presenta una gran biodiversidad (700 especies endémicas), siendo algunas de sus comunidades vegetales únicas en el mundo, como la Laurisilva (Bramwell, 1976). Actualmente existe un número limitado, aunque creciente de estudios referentes a su contenido en compuestos bioactivos en los que se han aislado diversas estructuras (diterpenos, sesquiterpenos y alcaloides) de especies endémicas de las familias Lauraceae, Boraginaceae y Compositae (Dominguez et al., 2008; Fraga et al., 1997, 2014; González-Coloma et al., 2001, 2011; Portero et al. 2012) con gran interés para el sector agroquímico (insecticidas, repelentes y fungicidas).

Estos resultados ponen de manifiesto el valor añadido de la biodiversidad de esta flora dado el amplio rango de aplicaciones potenciales de sus recursos botánicos (González-Coloma et al., 2001).

2. OBJETIVOS

General

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado ha sido investigar el potencial biotecnológico de hongos endófitos aislados de especies vegetales endémicas de Canarias, y evaluar su actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Geotrichum sp* y *Phoma sp*.

Específicos

- Cultivo en medio sólido de las cepas de hongos endófitos seleccionadas.
- Obtención biotecnológica de extractos bioplaguicidas fúngicos mediante la fermentación de los hongos en medio líquido.
- Determinar la actividad fungicida frente a hongos fitopatógenos con bioensayos de inhibición del crecimiento en placa.
- Evaluar la actividad de los extractos mediante análisis estadísticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Hongos endófitos

Las cepas de los hongos endófitos que fueron utilizadas en este trabajo, se seleccionaron a partir de la colección disponible en el grupo de investigación de Bioplaguicidas: Biotecnología y Química de Productos Naturales del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC). Se seleccionaron 21 cepas en base a datos previos de su actividad plaguicida frente a otras dianas biológicas (insectos, nematodos, etc.) y que habían sido aisladas a partir de hojas y tallos de diferentes especies vegetales endémicas de Canarias.

A cada una de estos hongos endófitos se le asignó un código por comodidad de manejo en el laboratorio (H1, H2, H3,... H21) (figura 1).

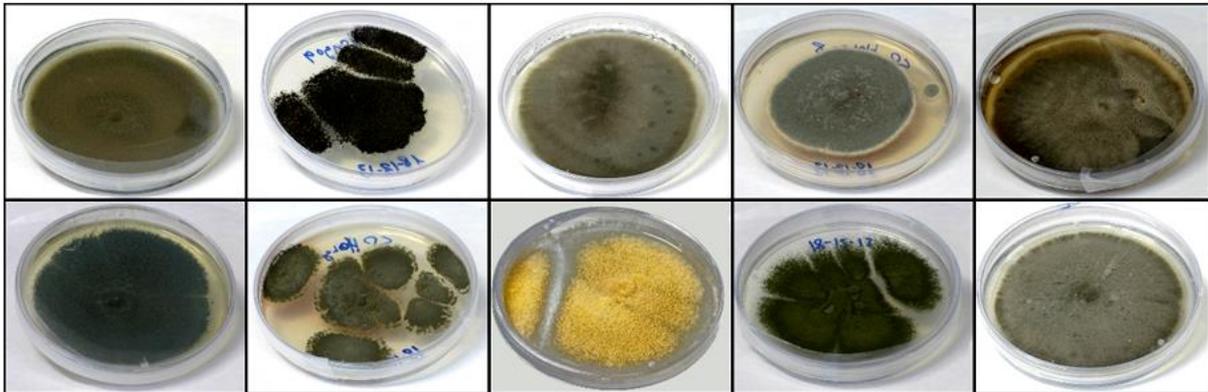


Figura 1. Cepas de endófitos.

Las cepas seleccionadas se mantuvieron empleando dos métodos de conservación diferentes:

- Réplica de los hongos endófitos en medio de cultivo PDA en placas petri a 25°C.
- Conservación en un congelador a -80°C. Una vez que las colonias de cada hongo aislado estaban crecidas, se tomaron 2-3 fragmentos de micelio por placa y se transfirieron a tubos de eppendorf estériles con glicerol al 18%. Periódicamente se descongelan y se vuelven a sembrar en medio de cultivo para comprobar la viabilidad de los aislados.

3.2. Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos seleccionados para llevar a cabo los bioensayos antifúngicos corresponden a tres especies del género *Fusarium*: *F. oxysporum* Schldt., *F. moniliforme* J. Shel., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Botrytis cinerea* (de Bary) Whetzel., *Alternaria*

alternata (Fr.) Keissl., *Geotrichum sp* y *Phoma sp*. Estos hongos fitopatógenos forman parte de la micoteca de la Unidad de Fitopatología (Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, Sección Biología). Las cepas fitopatógenas diana seleccionadas colonizan ciertos cultivos provocando enfermedades que generan enormes pérdidas en la agricultura a nivel mundial.

El género *Fusarium* pertenece al grupo de los Deuteromicetes, y es responsable de muchas enfermedades en los vegetales como son: marchitamiento, podredumbres radiculares y de tallos, podredumbre de frutos en general, alteraciones de la madera, etc.

Fusarium solani (figura 2. B) produce podredumbre seca de los tubérculos de la papa, y causa necrosis en raíces de tomate y berenjena.

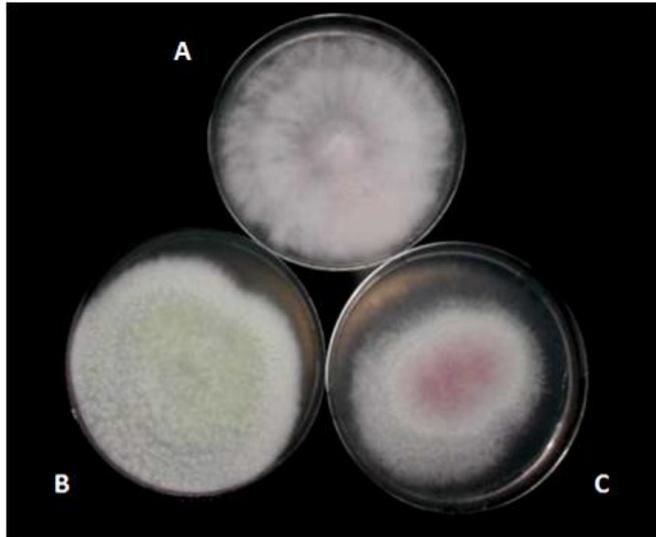


Figura 2. A) *F. moniliforme* B) *F. solani* C) *F. oxysporum*

F. oxysporum (figura 2. C) es la especie dentro de este género que causa más daños en los cultivos hortícolas. Además, se conocen muchas formas especializadas, cada una de ellas es generalmente un patógeno específico y estricto de una determinada hortaliza. Provoca necrosis en las raíces de las plantas. Al alcanzar los filamentos del micelio al cilindro central de la raíz, pasan a los vasos conductores y se multiplican rápidamente, formándose en éstos una goma parduzca que dificulta la circulación de la savia, por lo que es frecuente que aparezca el marchitamiento en la parte aérea del vegetal.

F. moniliforme (figura 2. A) ataca a especies de los géneros *Allium*, *Avena*, *Cocos*, *Solanum*, *Phoenix*, etc. La infección producida por este hongo se efectúa normalmente a partir de las raíces secundarias; asciende hacia las hojas aprovechando los vasos xilemáticos y produciendo de esta forma la infección y colonización de la planta. Además, el hongo produce una serie de toxinas que dan lugar a decoloraciones y obstrucción de los vasos xilemáticos, y contribuyen al marchitamiento y muerte de la planta.

Botrytis cinerea (figura 3) es un hongo fitopatógeno, responsable de la enfermedad denominada “podredumbre gris”, cuyo nombre se debe a que produce un moho gris pulverulento sobre los cultivos vegetales que infecta, especialmente en las hojas, flores y

frutos. Tiene una gran repercusión en el sector agrícola afectando a más de 235 especies de plantas cultivadas y silvestres, aunque su hospedador económicamente más importante es la uva, reduciendo su calidad y cantidad. También afecta a un amplio número de frutas blandas y hortalizas como las fresas y el tomate. Las infecciones por este hongo se caracterizan por la aparición de lesiones necróticas y pudrición, que van acompañadas de la secreción de sustancias que son las encargadas de destruir el tejido vegetal de la planta huésped.



Figura 3. *Botrytis cinerea*

Alternaria alternata (figura 4) es un hongo extremadamente común en abonos, plantas (fresas, crisantemos, tomates, zanahorias y espárragos), pulpa de madera y madera podrida, pero también se encuentra en alimentos y tejidos, así como en diferentes tipos de suelo. En los invernaderos con cultivos de crisantemos y tomates, se aísla de las plantas enfermas o muertas por su tendencia a habitar sustratos orgánicos en descomposición. Produce con frecuencia manchas negras en los tomates. Dentro de las viviendas puede aislarse del aire, polvo y lugares con humedad. Su distribución es universal y se considera que es un hongo de espacios abiertos.



Figura 4. *Alternaria alternata*

El género *Phoma* (figura 5) pertenece al filo *Ascomycota*. Las especies de este género constituyen patógenos que infectan numerosos cultivos (papaya, café, tomate, patatas, remolacha...), principalmente en los tejidos jóvenes causando podredumbres, marchitamiento en las flores y amarilleamiento o muerte de hojas, manchas negras en frutos y caídas prematuras.



Figura 5. *Phoma* sp.

Geotrichum sp (figura 6) pertenece al grupo de Ascomicetos. Es un hongo cosmopolita que se encuentra en suelo, agua, aire, detritos, plantas, cereales, productos lácteos y es común en la flora humana. Es un hongo patógeno de plantas que causa pudrición ácida de

frutas cítricas, tomates, zanahoria y algunas hortalizas. El hongo también puede causar una enfermedad de los pulmones u otros órganos en humanos conocidos como geotricosis.



Figura 6. *Geotrichum sp.*



Figura 7. Pudrición de corona

Las especies de hongos *A. alternata*, *F. solani*., *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Geotrichum sp*, entre otras, producen la principal enfermedad de postcosecha del plátano, conocida como pudrición de corona o “Crown rot” (figura 7). En la actualidad se estiman pérdidas de un 4-5% debido a esta enfermedad. El agente causal está constituido por un conjunto de especies fúngicas, catalogadas como “de herida o debilidad”, en la que participan la mayoría de las cepas fitopatógenas seleccionadas en este trabajo.

3.3. Obtención de los extractos fúngicos de endófitos

3.3.1. Cultivo en medio sólido

Las 21 cepas de hongos endófitos (H1-H21) seleccionadas se sembraron en placas de Petri que contenían medio PDA (Potato Dextrosa Agar). El medio PDA está formado por extracto de papa 4g/L, glucosa 20g/L y agar 15g/L.

Se preparó 1L de medio a una concentración de 39g/L (de acuerdo con la proporción recomendada por la casa comercial Sigma). Después, el medio de cultivo fue esterilizado en un autoclave Selecta modelo Auster 437-G calentando a 120°C durante 20-30 minutos. Posteriormente, se distribuyó en placas de Petri (10-15 ml) en condiciones asépticas bajo una cámara de flujo laminar modelo TELSTAR AV-100 que había sido previamente esterilizada con etanol al 80% y luz ultravioleta durante 20 minutos. Para la siembra de las cepas, se tomó una pequeña porción de micelio, con la ayuda de un asa de siembra previamente esterilizada con la llama de un mechero para asegurar las condiciones de asepsia, y se depositó en una nueva placa con el medio de cultivo fresco preparado.

Algunas de las cepas empleadas presentaron esporas con gran capacidad de dispersión y después de cada siembra se esterilizó la cámara con luz UV durante unos pocos minutos, para evitar de esta forma contaminaciones cruzadas entre ellas.

Una vez sembradas las placas, se sellaron con tiras de parafilm y se dejaron crecer en una cámara de cultivo a 25°C durante siete días. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron para la siguiente fase del trabajo aquellos hongos que presentaron la tasa de crecimiento más alta: H2, H4, H5, H7, H8, H9, H10, H17, H18 y H21. El resto de las cepas que no crecieron adecuadamente en medio sólido se descartaron, y no fueron estudiadas por falta de tiempo.

3.3.2. Preparación del medio de cultivo líquido

Para realizar el proceso de fermentación en medio líquido se preparó un volumen total de 9,4 L de medio de cultivo. La composición del medio líquido se recoge en la tabla 1.

Una vez disueltos los componentes del medio en agua destilada con la ayuda de un agitador magnético (figura 8), se ajustó el pH a 7 utilizando disoluciones de HCl 1N o NaOH 1N, en un pHmetro de la firma Crison modelo MicropH 2001.

A continuación, el medio de cultivo se distribuyó en 20 erlenmeyers de 250 ml y 40 de 500 ml, añadiendo 50 y 200 ml de medio respectivamente. Finalmente, los erlenmeyers con el medio fueron tapados con algodón y esterilizados en un autoclave durante 30 minutos junto con el resto de material necesario para la preparación de los preinóculos (puntas de pipeta, asa de siembra, espátula, etc.).

18,8 g	NaNO ₃
47 g	KH ₂ PO ₄
4,7 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O
94 mg	FeSO ₄ · 7H ₂ O
28,2 mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O
9,4 g	Extracto de levadura
564 g	Glucosa

Tabla 1. Composición del medio de cultivo líquido.



Figura 8. Agitador magnético

3.3.3. Preparación de preinóculos

Se prepararon preinóculos de las cepas seleccionadas que habían presentado un buen crecimiento en medio sólido placa después de siete días de incubación (H2, H4, H5, H7, H8, H9, H10, H17, H18 y H21). Estos preinóculos permiten establecer la fermentación en medio líquido a partir de un inóculo común para cada cepa y al mismo tiempo disminuir el tiempo de de la fase latencia inicial del cultivo durante su fermentación en medio líquido.

Para ello, bajo una campana de flujo laminar (figura 10) se añadió 10 ml de agua destilada estéril con una pipeta sobre la superficie del micelio de cada cepa de hongo endófito. Luego se raspó suavemente con una espátula estéril la superficie del micelio (figura 9) y cada una de estas suspensiones se pasó, con ayuda de una pipeta de 5 ml con la punta cortada, a un vial con tapa y se agitó en un vórtex, disgregando el micelio lo máximo posible. A continuación, el contenido de cada vial se vertió en un erlenmeyer de 250 ml que contenían 50ml de medio de cultivo líquido esterilizado y se incubaron en la cámara de cultivo en un agitador orbital de 100 rpm durante dos días a 25°C. Este proceso se realizó con dos placas de cultivo en medio sólido de cada cepa para asegurar la disponibilidad de material en la siguiente etapa del experimento.



Figura 9. Raspado del micelio



Figura 10. Cámara de flujo laminar con el material utilizado.

3.3.4. Fermentación en medio líquido

Transcurridos dos días después de la incubación de los preinóculos, se realizó la inoculación de 4 erlenmeyers de 500 ml para cada uno de los hongos endófitos. En una cámara de flujo laminar esterilizada y con la ayuda de una pipeta con punta cortada, se tomaron 15 mililitros de preinóculo y se vertieron en cada erlenmeyer que contenía 200 ml de

medio de cultivo (figura 11). Los hongos se cultivaron durante ocho días en las mismas condiciones descritas de agitación y temperatura en la cámara de cultivo (figura 12).



Figura 11. Inoculación del medio líquido con el preinóculo



Figura 12. Cultivo en medio líquido en el agitador orbital

3.3.5. Extracción del medio de cultivo

Finalizado el cultivo de los hongos en medio líquido, se realizó una filtración a vacío mediante un Büchner, con papel de filtro, para separar la fracción sólida, formada por el micelio, de la fase líquida, correspondiente al medio de cultivo. Antes de realizar la filtración se lavó el papel de filtro con una pequeña cantidad de disolvente orgánico, acetato de etilo (AcOEt), facilitando la adherencia del papel a la superficie filtrante, y posteriormente se vertió el contenido de los elermeryers (figura 13).



Figura 13. Filtración del cultivo en un Büchner

El medio de cultivo líquido se sometió a una extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico (AcOEt) en un embudo de decantación. Para ello, se vertió el filtrado en el embudo y se añadió el mismo volumen de AcOEt. La agitación el embudo permitió formar la mezcla de ambas fases y se dejó reposar hasta que se produjo su separación, la fase acuosa (más densa) de la fase orgánica (menos densa) (figura 14). Este proceso se repitió tres veces con cada medio de cultivo.



Figura 14. Extracción líquido-líquido



Figura 15. Concentración en un rotavapor.

3.3.6. Concentración del solvente de las extracciones

Las extracciones con el disolvente utilizado se secaron con sulfato sódico anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotavapor (figura 15) para obtener los extractos crudos de cada cepa de hongo cultivada.

Una vez concentrados los extractos, se disolvieron en una pequeña cantidad de AcOEt para pasarlos a un vial que había sido pesado previamente. En ocasiones, fue necesario añadir un disolvente más polar como el metanol para poder disolver bien todo el extracto y/o la aplicación de ultrasonido.

Finalmente, se dejó evaporar el resto de disolvente de los extractos en los viales a temperatura ambiente (48 horas aproximadamente) y se pesaron para calcular la cantidad de extracto obtenido de cada cepa.

3.4. Bioensayos de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos

Existen varios métodos para evaluar la actividad fungicida de extractos y/o compuestos de frente sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos, y determinar su efectividad en el control de plagas fúngicas. En este trabajo se ha empleado el método de inhibición del crecimiento en placas de Petri con medio de cultivo en el que se añadió el producto diluido a ensayar antes de solidificación (Murabayashi, 1991).

Los ensayos se realizaron con los extractos fúngicos de hongos endófitos con el fin de determinar su actividad antifúngica sobre el crecimiento de los organismos patógenos diana: *B. cinerea*, *A. alternata*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*., *Geotrichum sp* y *Phoma sp*.

3.4.1. Cultivo de hongos fitopatógenos

Las cepas de hongos fitopatógenos empleadas en este trabajo se cultivan periódicamente en medio PDA con cloranfenicol en placas de Petri para mantener las colonias en buen estado.

Se preparó medio de cultivo PDA a una concentración de 39g/L y se esterilizó en un autoclave a 0,8 kg/cm² a una temperatura de 120°C durante 40 minutos aproximadamente. Posteriormente, el medio fue distribuido en placas de Petri y una vez solidificado se realizó la siembra de los hongos fitopátógenos con la ayuda de un asa de siembra en una cámara de flujo laminar. Las cepas se dejaron crecer en una cámara de cultivo en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 27°C durante una semana.

3.4.2. Preparación del medio de cultivo de los ensayos

El medio de cultivo empleado en estos bioensayos fue el PDA que se preparó a una concentración de 39g/ml, y se distribuyó en tubos de ensayo (5 ml cada uno) con una pipeta automática. Una vez esterilizados en el autoclave, los tubos con el medio de cultivo se colocaron dentro de un vaso de precipitado con agua caliente, para impedir la solidificación del medio, dentro de la campana de flujo laminar. A cada uno de se les añadió el correspondiente volumen de la disolución a ensayar y etanol, dependiendo de la concentración a ensayar como se muestra en la tabla 2, vertiendo posteriormente su contenido en una placa Petri para permitir la solidificación del medio de cultivo. Paralelamente se prepararon placas Petri como controles para cada una de los hongos diana, en las que al medio de cultivo sólo se

añadió etanol a la misma concentración que las placas destinadas a los bioensayos de los extractos.

Las soluciones stock de los extractos de los hongos endófitos a ensayar se prepararon a una concentración de 40 mg/ml en etanol. Por otro lado, se preparó una solución de sales de tetrazolium (TLC o Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) diluyendo 20 mg en 4 ml de agua destilada estéril. Esta solución se empleó para añadir un volumen de 25 μ l en los tubos con medio de cultivo para los ensayos de las especies fitopatógenas del género *Fusarium*, facilitando la medición del diámetro de estas colonias.

La concentración inicial ensayada para todos los extractos fue de 1 mg/ml. En aquellos casos en que los extractos presentaron una actividad superior al 40-45% se ensayaron otras dos concentraciones menores (0,5 y 0,1 mg/ml) para determinar la EC₅₀, es decir, la cantidad de extracto necesaria para inhibir el 50% del crecimiento del organismo fitopatógeno.

Concentración mg/ml	Cantidad stock (μ l)	Cantidad etanol (μ l)	Volumen final (μ l)
1	125	0	125
0,5	62,5	62,5	125
0,1	12,5	112,5	125
Control	0	125	125

Tabla 2. Cantidades de solución stock y etanol en función a las concentraciones ensayadas.

3.4.3. Siembra de los fitopatógenos diana

Una vez que el medio de cultivo con los extractos había solidificado, se realizó la siembra los patógenos diana a partir de colonias bien desarrolladas. Se utilizaron dos tipos de siembra: siembras en picadura en cada placa mediante un asa de siembra previamente esterilizada (este método se utilizó sólo para los hongos del género *Fusarium*), o mediante fragmentos de micelio o “discos” realizados con un sacabocado para que sean del mismo tamaño (figura 16). En cada placa se realizaron ocho siembras de cada patógeno diana.

A continuación, las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 48 horas en los ensayos con *B. cinerea*, *A. alternata*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* y *F. solani*, y 72 horas con *Geotrichum sp* y *Phoma sp.*, ya que estos hongos poseen una tasa de crecimiento más lenta que el resto en las mismas condiciones.

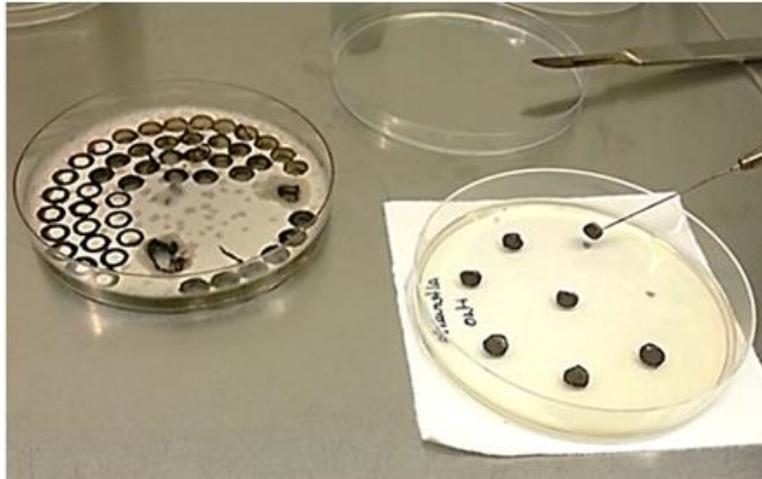


Figura 16. Siembra de discos.

3.4.4. Análisis de datos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se escanearon las placas para digitalizar las imágenes de las mismas y luego se midió el diámetro del crecimiento de las colonias con el programa ImageJ.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento comparando el diámetro de las colonias que han crecido a las diferentes concentraciones de extractos con el crecimiento de las colonias en las placas control mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(C-T)}{C} \times 100$$

C: Promedio del diámetro de las colonias crecidas en las placas control.

T: Promedio del diámetro de las colonias crecidas en las placas con los extractos a diferentes concentraciones.

Por tanto, es un método cuantitativo que permite medir el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de las colonias. Estos cálculos se realizaron con el programa Microsoft Excel 2013. El cálculo de de la concentración eficaz que inhibe el 50% del crecimiento (EC50) y sus límites de confianza se realizó con el programa IBM SPSS Statistics.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención biotecnológica de extractos de hongos endófitos

En este trabajo se utilizaron 21 cepas de hongos endófitos aisladas de especies vegetales endémicas Canarias de las cuales se tienen datos previos de su actividad plaguicida frente a otras dianas biológicas.

Se sembraron en placas de Petri que contenían medio PDA, y fueron incubadas en una cámara de cultivo a 25°C durante siete días. Las cepas que mostraron un buen crecimiento en medio sólido (H2, H4, H5, H7, H8, H9, H10, H17, H18 y H21) fueron seleccionadas para establecer su cultivo en medio líquido.

La fermentación en medio líquido de las especies fúngicas se realizó en erlenmeyers con un volumen final de 800 ml de medio a partir de un inóculo común preparado en el mismo medio de cultivo. El periodo de crecimiento y las condiciones de agitación y temperatura empleadas, como se ha descrito anteriormente, fueron las mismas para todas las cepas, con el fin de comparar el rendimiento de los extractos obtenidos. En la tabla 3 se muestran los pesos de los extractos obtenidos en miligramos, así como el rendimiento del cultivo expresado en g/L.

Cepa	Peso extracto (mg)	Rendimiento (g/L)
H2	265	0,21
H4	265	0,21
H5	220	0,17
H7	231	0,18
H8	220	0,17
H9	443	0,35
H10	134	0,10
H17	258	0,20
H18	353	0,28
H21	136	0,10

Tabla 3. Pesos de los extractos fúngicos.

En las condiciones de cultivo empleadas todas las cepas presentan un rendimiento de extractos similares, dentro de un rango de 0,20 g/L - 0,35g/L, excepto las cepas H10 y H21 en las que es algo menor. Las condiciones de producción iniciales de estos microextractos fúngicos permitirán establecer un punto de partida para llevar a cabo la optimización de la fermentación (nutrientes, tiempo de incubación, etc.) para su obtención en un futuro a mayor escala.

Bioensayos de actividad antifúngica de los extractos de hongos endófitos

Para evaluar la actividad fungicida se realizaron bioensayos de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos en placas de Petri. Los extractos fueron ensayados frente a hongos fitopatógenos disponibles *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*., *Geotrichum sp.* y *Phoma sp.*, causantes de importantes daños y pérdidas en la agricultura.

Después del tiempo de incubación de los extractos, las placas fueron escaneadas para digitalizar las imágenes de las mismas obteniendo los primeros resultados cualitativos en los que fueron visibles las diferencias entre el crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos en presencia de los extractos de endófitos, frente a las colonias en las placas control (figura 17).

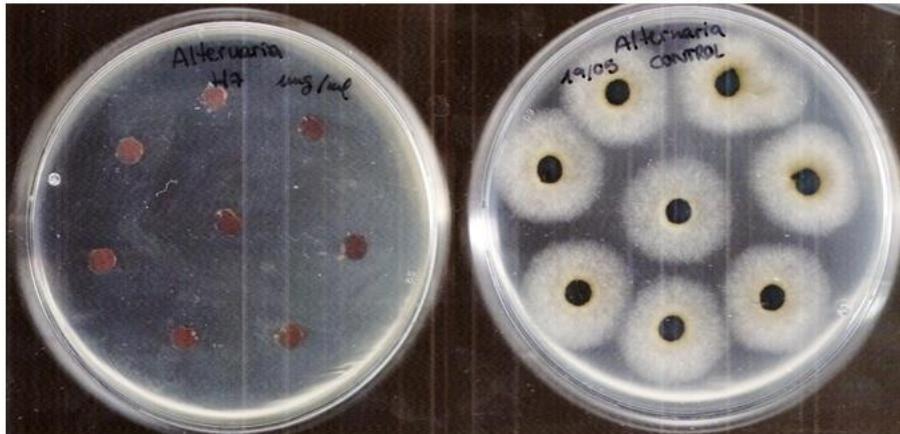


Figura 17. Bioensayo de inhibición de H7 frente a *A. alternata* (1mg/ml)

Los primeros ensayos se realizaron a una concentración de extracto de 1mg/ml y la toma de datos se realizó midiendo el diámetro del crecimiento de las colonias con el programa ImageJ.

Con el programa Microsoft Excel 2013 se calculó el promedio de los diámetros del crecimiento de las colonias los hongos fitopatógenos y el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada bioensayo.

Con este programa también se determinaron sus datos estadísticos descriptivos (error típico, mediana, moda, desviación estándar, etc...).

A continuación, en la tabla 4 se presentan los resultados de los ensayos de actividad antifúngica de los extractos a una concentración de 1mg/ml frente a los diferentes hongos diana.

	<i>B.cinerea</i>	<i>A.alternata</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
H2	100,00	92,37	46,66	43,84	69,50	100,00	100,00
H4	87,64	61,35	43,69	42,44	55,00	41,04	100,00
H5	100,00	81,55	53,30	53,23	67,24	64,52	100,00
H7	100,00	100,00	65,09	67,01	77,38	100,00	100,00
H8	29,19	7,60	-8,23	26,21	25,45	13,63	58,09
H9	18,48	10,53	28,76	17,43	26,31	34,12	52,83
H10	39,12	18,97	18,11	19,53	9,92	100,00	100,00
H17	69,76	33,17	49,63	37,85	31,28	88,41	100,00
H18	21,86	-2,84	-12,72	24,42	13,78	13,34	25,53
H21	-5,11	-2,84	-1,49	2,90	3,20	8,60	10,33

Tabla 4. Actividad antifúngica de los extractos sobre los hongos fitopatógenos (1mg/ml)

Todos los hongos fitopatógenos empleados en este trabajo vieron afectados su crecimiento por varios de los extractos de hongos endófitos ensayados.

Geotrichum sp. y *Phoma sp.*, resultaron ser los hongos fitopatógenos más sensibles. Del total de extractos, 70% fueron activos frente a *Geotrichum sp.* y un 60 % frente a *Phoma sp.*, seguidos de *B. cinerea* y *A. alternata* que vieron afectados significativamente su crecimiento por más de un 40% de los extractos. Los hongos del género *Fusarium* fueron los menos sensibles inhibiendo su crecimiento de forma más moderada por los extractos de H2, H4, H5 y H7.

El hongo endófito más activo frente a todas las dianas fue H7, presentando un porcentaje de inhibición del 100% frente a *B. cinerea*, *A. alternata*, *Geotrichum sp.* y *Phoma sp.*, y superior al 65% frente a las especies del género *Fusarium*.

Presentaron también actividad fungicida los extractos de H2, H4 y H5 a la concentración de 1mg/ml, con una inhibición del crecimiento superior a un 40-45% sobre todas las dianas. Entre estos extractos cabe destacar la inhibición del crecimiento del 100% de H2 frente a *B. cinerea*, *Geotrichum sp.* y *Phoma sp.*; H4 frente a *Phoma sp.* y H5 frente a *B. cinerea* y *Phoma sp.*.

Algunos extractos presentaron actividad antifúngica solo frente a unos hongos dianas. H10 inhibió el 100% del crecimiento de *Phoma sp.* y *Geotrichum sp.*; H9 mostró un porcentaje de inhibición 52,8% sobre *Phoma sp.*; y el extracto de H17 presentó una potente

actividad antifúngica ($I\%=100$) frente a *Geotrichum sp*, y más moderada frente a *Geotrichum sp*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*.

Los extractos de los hongos endófitos que no presentaron actividad frente a ninguno de los hongos dianas fueron los procedentes de las cepas H8, H18 y H21.

En aquellos casos en que los extractos presentaron una actividad superior al 40-45% se realizaron ensayos a otras dos concentraciones menores (0,5 y 0,1 mg/ml) (figura 18) para determinar la EC_{50} (dosis a la cual se produce un 50% de inhibición de del crecimiento) con el programa IBM SPSS Statistics, así como los límites superiores e inferiores de confianza.

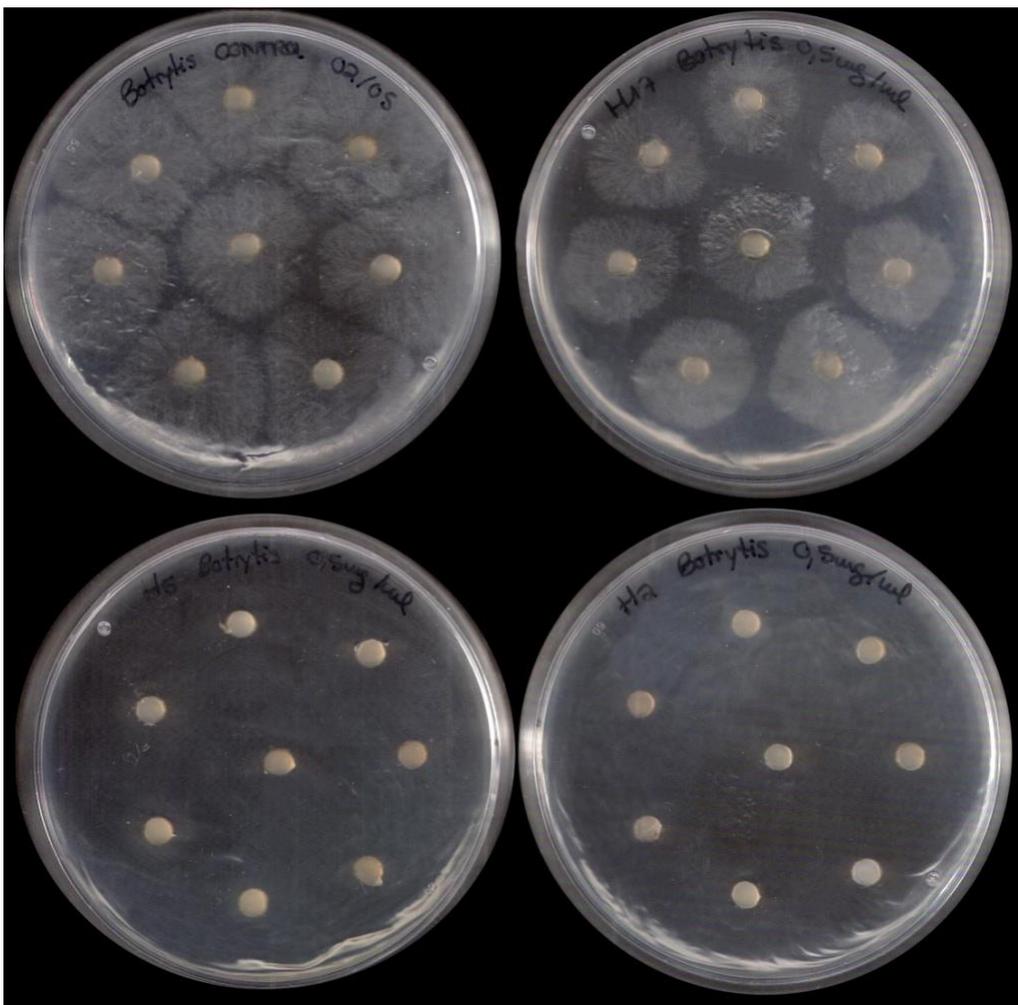
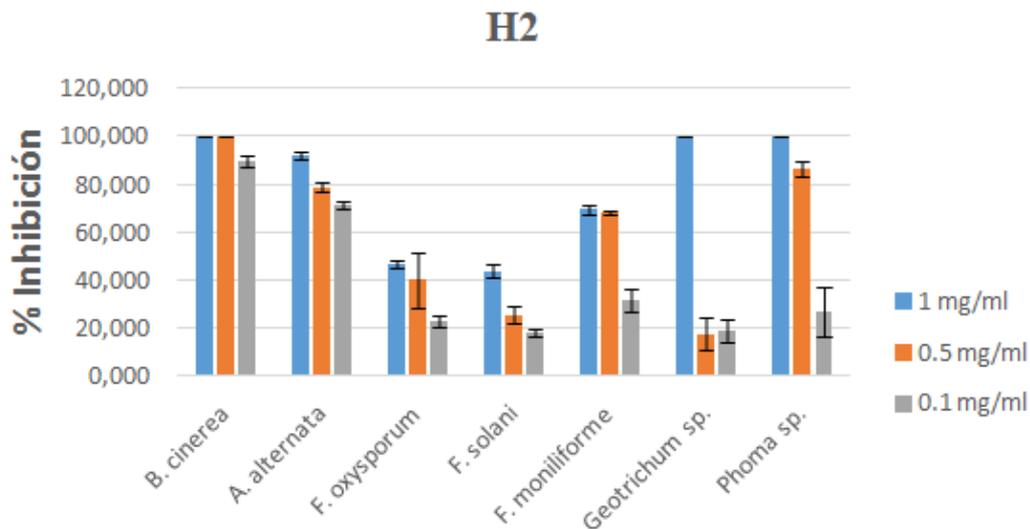


Figura 18. Bioensayos de inhibición de H17, H5 y H2 sobre *B. cinerea* (0,5mg/ml)

El resumen de estos cálculos se muestra en las siguientes tablas y/o gráficas:

H2	<i>B.cinerea</i>	<i>A.alternata</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
1 mg/ml	100,00	92,37	46,66	43,84	69,50	100,00	100,00
0.5 mg/ml	100,00	78,66	40,18	25,60	68,36	17,80	86,48
0.1 mg/ml	89,56	71,35	22,92	17,95	31,59	18,83	26,77
Ec50	0,68 mg/ml	0,57 mg/ml (0,53-0,61)	1,27 mg/ml	1,48 mg/ml (1,18-2,83)	0,25 mg/ml (0,002-0,85)	0,63 mg/ml (0,56-0,71)	0,41 mg/ml

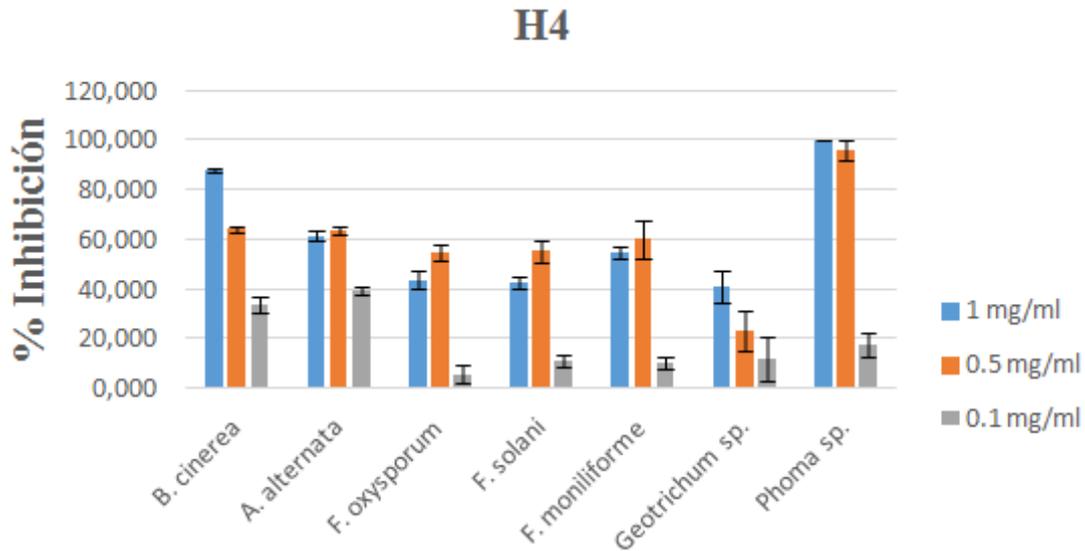
Tabla 5. Inhibición de H2 frente a los hongos ensayados y correspondientes EC₅₀.



Gráfica 1. Actividad antifúngica de H2 expresado como porcentaje de inhibición.

H4	<i>B.cinerea</i>	<i>A.alternata</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
1 mg/ml	87,64	61,35	43,69	42,44	55,00	41,04	100,00
0.5 mg/ml	64,16	63,74	54,56	55,06	59,96	23,32	95,91
0.1 mg/ml	33,91	39,54	5,56	11,02	10,12	11,70	17,18
Ec50	0,53 mg/ml (0,45-0,60)	0,23 mg/ml (0,00-2,29)	0,82 mg/ml (0,17-1,91)	0,85 mg/ml (0,18-1,89)	0,56 mg/ml (0,26-0,87)	4,75 mg/ml	0,33 mg/ml (0,11-0,40)

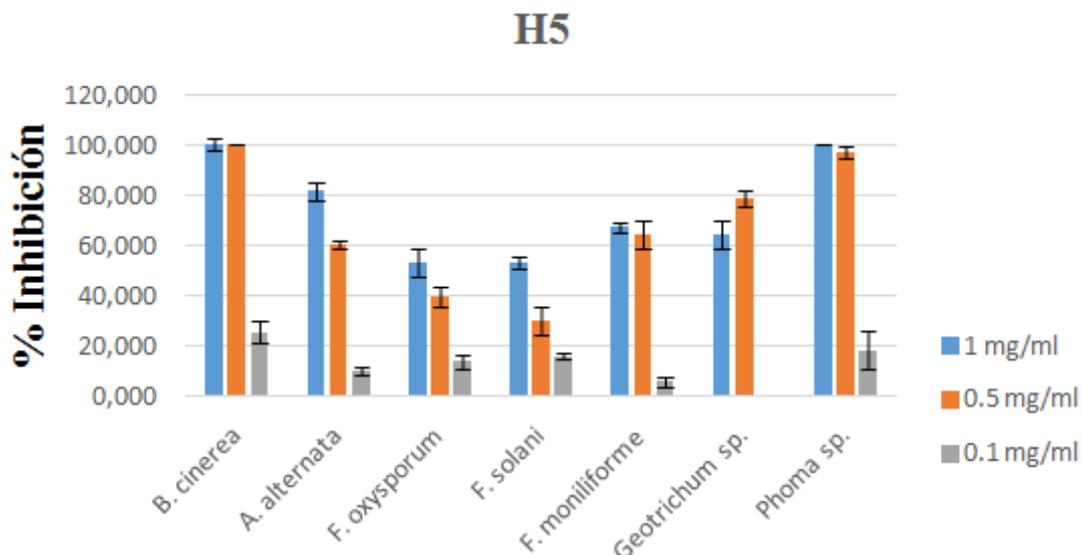
Tabla 6. Inhibición de H4 frente a los hongos ensayados y correspondientes EC₅₀.



Gráfica 2. Actividad antifúngica de H4 expresado como porcentaje de inhibición.

H5	<i>B.cinerea</i>	<i>A.alternata</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
1 mg/ml	100,00	81,55	53,30	53,23	67,24	64,52	100,00
0.5 mg/ml	100,00	60,13	39,54	29,79	64,26	78,32	97,11
0.1 mg/ml	25,39	9,73	13,68	15,92	5,86	0	18,24
Ec50	-	0,38 mg/ml (0,16-0,54)	0,85 mg/ml	1,12 mg/ml (0,92-1,63)	0,45 mg/ml (0,30-0,60)	0,34 mg/ml (0,01-0,97)	0,26 mg/ml (0,10-0,34)

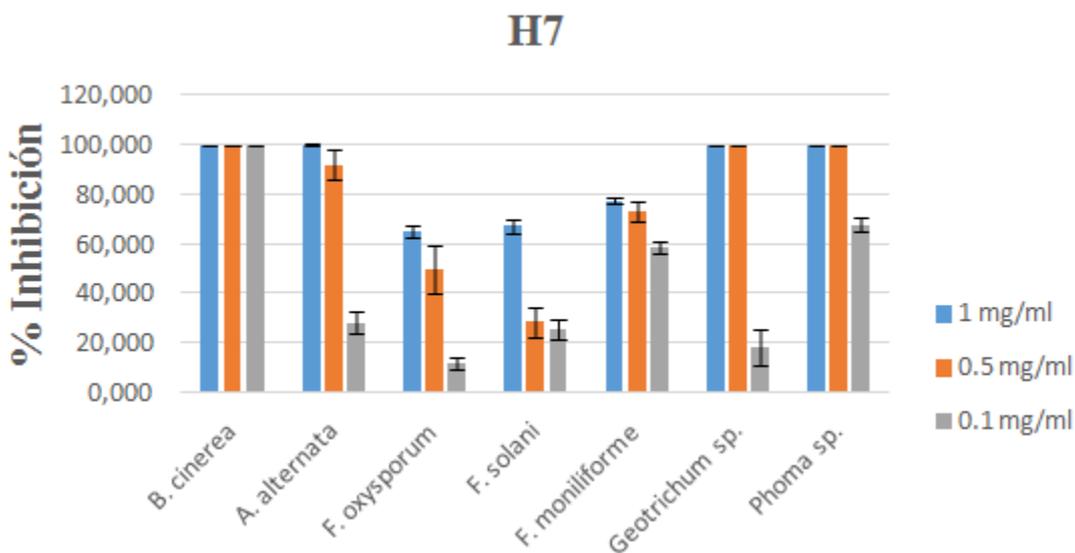
Tabla 7. Inhibición de H5 frente a los hongos ensayados y correspondientes EC₅₀.



Gráfica 3. Actividad antifúngica de H5 expresado como porcentaje de inhibición.

H7	<i>B.cinerea</i>	<i>A.alternata</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.moniliforme</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
1 mg/ml	100,00	100,00	65,09	67,01	77,39	100,00	100,00
0.5 mg/ml	100,00	91,76	49,78	28,25	73,06	100,00	100,00
0.1 mg/ml	100,00	28,15	11,35	25,037	58,38	18,04	67,81
Ec50	-	0,31 mg/ml (0,16-0,37)	0,53 mg/ml (0,69-0,86)	0,95 mg/ml	0,94 mg/ml (0,00-1,03)	0,14 mg/ml	-

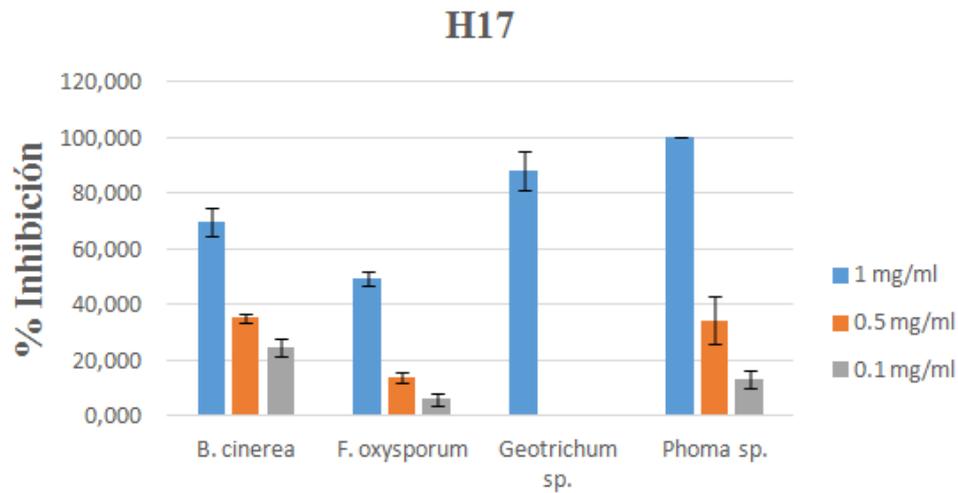
Tabla 8. Inhibición de H7 frente a los hongos ensayados y correspondientes EC₅₀.



Gráfica 4. Actividad antifúngica de H7 expresado como porcentaje de inhibición.

H17	<i>B.cinerea</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
1 mg/ml	69,76	49,63	88,41	100,00
0.5 mg/ml	35,46	13,66	0	34,36
0.1 mg/ml	24,53	6,11	0	13,17
Ec50	0,87 mg/ml (0,73-1,02)	1,05 mg/ml (0,96-1,18)	-	0,60 mg/ml (0,52-0,69)

Tabla 9. Inhibición de H17 frente a los hongos ensayados y correspondientes EC₅₀.



Gráfica 5. Actividad antifúngica de H17 expresado como porcentaje de inhibición.

H9	<i>Phoma sp.</i>	H10	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Phoma sp.</i>
1 mg/ml	52,83	1 mg/ml	100,00	100,00
0.5 mg/ml	52,52	0.5 mg/ml	32,52	27,29
0.1 mg/ml	30,23	0.1 mg/ml	27,19	17,97
Ec50	0,58 mg/ml	Ec50	0,55 mg/ml (0,47-3,39)	0,65 mg/ml (0,52-0,86)

Tabla 10. Inhibición de H9 y H10 frente a los hongos ensayados y correspondientes EC₅₀.

En los ensayos con una concentración de 0,5 mg/ml de extracto, se observa una disminución del porcentaje de inhibición en comparación a los ensayos realizados a 1mg/ml. No obstante, en la mayoría de los casos no fue muy significativa y siguieron presentando porcentajes de inhibición superiores al 40-45% frente a la mayoría de los hongos dianas.

El extracto de H2 volvió a mostrar una inhibición significativa frente a todas las dianas excepto para *F. solani* y *Geotrichum sp.*, H4 también perdió su actividad frente a *Geotrichum sp.*, H5 sobre *F. oxysporum* y *F. solani*. Además los extractos H10 y H17 (que eran activos frente a unas dianas a 1mg/ml) a 0,5mg/ml no presentaron una inhibición superior al 40% sobre ninguna diana.

Los extractos que mantienen su actividad antifúngica con un porcentaje de inhibición significativo a la concentración más baja (0,1mg/ml) fueron H2 sobre *B. cinerea* (89,5%) y *A. alternata* (71,3%); y H7 frente a *B. cinerea* (100%), *F. moniliforme* (58,4%) y *Phoma sp.* (67,8%).

Entre los extractos de ensayados, H2 y H7 fueron las cepas de hongos endófitos que presentaron un mayor porcentaje de inhibición sobre los siete hongos fitopatógenos a todas las concentraciones ensayadas.

En general, estos resultados muestran actividades antifúngicas muy altas, que no nos permiten el cálculo de la EC_{50} en un gran número de ensayos. Para poder lograr realizar al cálculo se necesitaría realizar otros bioensayos con concentraciones menores de los extractos. Entre los valores calculados cabe destacar el de H7 sobre *Geotrichum sp.*, H4 frente a *A. alternata* y H5 sobre *Phoma sp.* con una EC_{50} de 0,14; 0,23 y 0,26 mg/ml respectivamente.

Algunos de los endófitos estudiados poseen una importante actividad antifúngica, sobre hongos fitopatógenos que actualmente están generando numerosas pérdidas en todo el mundo en los cultivos agrícolas como el plátano, tomate, viña, etc.

Actualmente, algunos de estos hongos fitopatógenos están presentando resistencia frente a los pesticidas químicos comerciales. Un estudio realizado en cultivos de tomates en invernadero *B. cinerea* mostró resistencia frente al carbendazim, iprodiona, pirimetanil y dietofencarb, en un 74,2; 86,4; 28,8 y 31,8%, respectivamente (Rodríguez A. *et al.*, 2014).

Estos resultados muestran que varios de los hongos endófitos estudiados son potencialmente útiles como bioplaguicidas fúngicos para el control de plagas agrícolas, proporcionando un valor añadido a las especies vegetales endémicas canarias de origen.

5. CONCLUSIONES

- Todos los hongos fitopatógenos empleados en este trabajo vieron afectado su crecimiento por uno o varios de los extractos de hongos endófitos ensayados a una concentración de 1mg/ml.
- La mayoría de los extractos de endófitos estudiados presentaron actividad fungicida frente a uno o varios de los hongos fitopatógenos, excepto los de las cepas H8, H18 y H21.

- Los extractos que mostraron un porcentaje de inhibición del crecimiento superior a un 40-45%, a la concentración de 1mg/ml frente a todas las dianas empleadas fueron las cepas H2, H4, H5 y H7.
- EL endófito H7 presenta una potente actividad fungicida sobre *Botrytis cinerea*, con un porcentaje de inhibición del 100% a todas las dosis ensayadas.
- En general, los extractos de las cepas H2 y H7 fueron los más activos a todas las concentraciones ensayadas. Se plantean como candidatos prometedores para su obtención biotecnológica con la identificación de sus componentes activos y su desarrollo como bioplaguicidas fúngicos.
- Este trabajo ha aportado un valor añadido a la flora endémica canaria, puesto que constituye el material de partida de los hongos endófitos estudiados.

Conclusions

- The growth of all phytopathogenic fungi used in this study was affected by one or more extracts of endophytic fungi tested at a concentration of 1mg/ml.
- Most extracts endophytes studied presented fungicidal activity against one or more phytopathogenic fungi, except extracts from strains H8, H18 and H21.
- The extracts showed higher percent inhibition of growth by 40-45% at concentration of 1mg / ml against all targets used were H2, H4, H5 and H7.
- H7 endophyte has potent fungicidal activity against *Botrytis cinerea*, with a percentage of inhibition was 100% at all doses tested.
- Overall, extracts from H2 and H7 strains were the most active at all concentrations tested. They are proposed as promising candidates for the biotechnology production with the identification of their active compounds and their development as fungal biopesticides.
- In this work, it has provided an added value to the Canarian endemic flora, since it constitutes the starting material of endophytes studied.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bary A. (1866). Morphologie und Physiologie der Pilze. Flechten und Myxomyceten. Engelman. Hofmeister's Handbook of physiological Botany, Vol. 2, Leipzig.
- Bramwell D. (1976). Endemism in the flora of the Canary Islands. In: Biogeography and ecology in the Canary Islands. 207-240.
- Chowdhary K., Kaushik N., González-Coloma A., Cabrera R. (2012). Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. *Phytochem. Rev.* 11:467-485.
- Domínguez D.M., Reina M., Santos-Guerra A., Santana O., Agulló T., López-Balboa C., González-Coloma A. (2008). Pyrrolizidine Alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. *Biochemical Syst. Ecol.* 36, 153-166.
- Fraga B.M., González-Coloma A., Gutiérrez C. & Terrero D. (1997). Iso-ryanodane diterpenes from *Persea Indica*. *J. Nat. Prod.* 60: 880-883.
- Giménez C., Cabrera R., Reina M., Gonzalez-Coloma A. (2007). Fungal endophytes and their role in plant protection. *Curr. Org. Chem.* 11:707-720.
- González-Coloma A.; Gutiérrez C.; Cabrera R; Reina M.; Díaz C. E. & Fraga, B.M. (2001). Agroquímicos naturales de especies endémicas de las Islas Canarias: un valor añadido a la biodiversidad. En “Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación”. Ed. PyB. Mexico.
- González-Coloma A., López-Balboa C., Santana O., Reina M., Fraga B.M. (2011). Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.* 10:245–260.
- Gunatilaka, A.A.L. (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.*, 69, 509-526
- Kaul S., Gupta S., Ahmed M. y Dhar M. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry*.11: 487- 505.
- Khawar et al. (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. (2011) *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1208-1228

- Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem Biol.* 19: 792-798.
- Mittenneier R.A., Myers N., Gil P. R. & Mittermeier C. G. (1999). Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions (Cemex, Conservation International and Agrupacion Sierra Madre. Monterrey, Mexico, 1999).
- Murabayashi A., Masuko M., Niikawa M., Shirane N., Furuta T., Makisumi Y. (1991). Antifungal and plant growth inhibitory activities of stereo optical isomers of 2-triazolylcycloalkanol derivatives. *J. Pesticide Sci.* 12: 419-427.
- Portero A.G., González-Coloma A., Reina M., Díaz C.E. (2012). Plant-defensive sesquiterpenoids from *Senecio* species with biopesticide potential. *Phytochemistry Rev.* 11: 391-403.
- Rodríguez A., Acosta A., Rodríguez C. (2014). Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in tomato greenhouses in the Canary Islands and effectiveness of non-chemical treatments against gray mold.
- Rodríguez R.J., White J. F., Arnold A. E. and Redman R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.
- Rosa L.H. et al (2011). Drug Development, A case study based insight into modern strategies. Ed. Rundfeldt, C. 1-18.
- Sánchez-Fernández R.E. et al. (2013). Hongos endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos secundarios Bioactivos con utilidad en agricultura y Medicina. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2): 132-146
- Strobel G. y Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol R.* 67 (4): 491-502.
- Tan R. X. and Zou W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 448-459.