

# Diversidad y distribución de hongos endófitos en *Plocama pendula* Ait. (Endemismo canario).

Diversity and distribution of endophytic fungi in *Plocama  
pendula* Ait. (Canarian Endemism).



**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**PAULA GONZÁLEZ DELGADO**

Tutorizado por **Cristina Giménez Mariño** (Fisiología Vegetal) y  
**Carmen Elisa Díaz Hernández** (IPNA-CSIC).

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias,  
Sección Biología e Instituto de Productos Naturales (IPNA-CSIC).

**GRADO EN BIOLOGÍA**

SEPTIEMBRE, 2017

## ÍNDICE:

Resumen:.....	1
1. Introducción. ....	2
1.1 <i>Plocama pendula</i> (Aiton). ....	2
1.1.1 Descripción botánica. ....	2
1.1.2 Usos de <i>Plocama pendula</i> Ait. ....	3
1.2 Hongos endófitos. ....	3
1.2.1 Relación endófito-huésped. ....	4
1.2.2 Potencial biotecnológico. ....	4
2. Objetivos. ....	6
2.1 General. ....	6
2.2 Específicos. ....	6
3. Material y métodos. ....	6
3.1 Obtención y aislamiento de los hongos endófitos. ....	6
3.1.1 Recolección del material vegetal. ....	6
3.1.2 Preparación y esterilización del material vegetal. ....	7
3.1.3 Siembra de los explantos. ....	9
3.2 Identificación de los aislados. ....	10
3.2.1 Identificación microscópica. ....	10
3.2.2 Identificación molecular. ....	10
3.3 Bioensayos de antagonismo. ....	10
3.3.1 Hongos fitopatógenos. ....	11
3.3.2 Preparación del bioensayo de antagonismo. ....	12
3.4 Conservación. ....	12
3.5 Análisis de la diversidad de los hongos endófitos. ....	12
3.5.1 Índice de diversidad de Simpson. ....	12
3.5.2 Frecuencia de colonización. ....	13

3.5.3 Índice de Margalef. ....	13
3.5.4 Coeficiente de similitud de Jaccard.....	13
4. Resultados y discusión. ....	13
4.1. Aislamiento de los endófitos.....	13
4.2 Identificación y descripción de las cepas fúngicas. ....	15
4.3 Análisis estadístico. ....	22
4.3 Actividad antagónica:.....	27
5. Conclusiones.....	28
6. Bibliografía. ....	30

## Resumen:

En este trabajo se ha estudiado, la biodiversidad y el potencial antagonista, de los hongos endófitos presentes en la especie endémica *Plocama pendula*, muestreada en tres hábitats diferentes dentro de la isla de Tenerife. Fueron 20 el número de especies fúngicas aisladas del material vegetal seleccionado, siendo pocas las especies dominantes (P1, P4 y P19) y muchas las especies representadas con bajas frecuencias. Por otro lado, se estudió la capacidad inhibitoria del crecimiento de tres hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, por parte de los hongos endófitos aislados en esta especie, con resultados positivos, dado que la mayoría presentó actividad antagónica incluso frente a las 3 dianas. Finalmente, determinar que las especies de hongos endófitos aislados pueden tener un alto potencial biotecnológico, dada sus posibles implicaciones médicas o agrícolas entre otras.

**Palabras claves:** *Plocama pendula*, hongos endófitos, potencial biotecnológico, potencial antagonista, hongos fitopatógenos.

## Abstract:

In this work, the biodiversity and the antagonistic potential of the endophytic fungi present in the endemic species *Plocama pendula*, sampled in three different habitats within the island of Tenerife, have been studied. The number of fungal species isolated from the selected plant material was 20, with few dominant species (P1, P4 and P19) and many species represented with low frequencies. On the other hand, the growth inhibitory capacity of three phytopathogenic fungi, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, was studied by the endophytic fungi isolated in this species, with positive results, since the majority presented antagonistic activity even compared to the 3 targets. Finally, to determine that species of isolated endophyte fungi may have a high biotechnological potential, given their possible medical or agricultural implications among others.

**Key words:** *Plocama pendula*, endophytic fungi, biotechnological potential, antagonistic potential, phytopathogenic fungi.

## 1. Introducción.

La biodiversidad botánica que caracteriza a la flora de las Islas Canarias y el uso tradicional de algunas de sus especies vegetales confiere a esta flora un valor añadido. Por ello, la flora canaria ha sido y es objeto de múltiples estudios relacionados con la actividad biológica de algunas de sus especies endémicas (**Quintana, 2006**).

### 1.1 *Plocama pendula* (Aiton).

*Plocama pendula* Ait. (Rubiaceae) se considera un paleoendemismo de las Islas Canarias conocido por el nombre aborigen "balo". En un principio se consideraba como la única especie del género *Plocama*, indicando un claro aislamiento taxonómico (**Eriksson et al., 1979**). Sin embargo, estudios recientes, basados en el análisis de datos moleculares de ADN cloroplástico, sugirieron la inclusión en este género de 33 especies de otros ocho géneros, lo cual implica que el género *Plocama* está formado por 34 especies (**Fraga et al., 2009**).

Es considerada como la planta más característica de la comunidad denominada como *Plocametum pendulae* ("balera"), una comunidad nano y microfanerofítica arbustiva que crece en depósitos aluviales en cursos de agua secos dentro del bioclima desértico y en menor medida en territorios dentro del bioclima xérico y del ombrotipo semiárido inferior (**Del Arco Aguilar et al., 2010**).

#### 1.1.1 Descripción botánica.

Presente en todas las islas del archipiélago, este endemismo canario es bastante frecuente salvo en las islas de Lanzarote y Fuerteventura. Se trata de un arbusto muy ramificado desde la base, con ramas flexibles y pendulares, alcanzando una altura de hasta 2 metros. Las hojas son filiformes, de color verde, algo carnosas, pudiendo alcanzar los 5cm de longitud. Las flores son diminutas y blanquecinas, tanto las axilares como las de la parte extrema de las ramas más jóvenes o terminales. La corola presenta de 5 a 7 lóbulos, siendo los frutos pequeñas bayas globosas, translúcidas en primera instancia pero de color negruzco al madurar (**Cabrera, 1999**).

<b>División/ Filo</b>	Spermatophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Gentianales
<b>Familia</b>	Rubiaceae
<b>Género</b>	<i>Plocama</i>
<b>Especie</b>	<i>P. pendula</i>
<b>Nombre común</b>	Balo



### 1.1.2 Usos de *Plocama pendula* Ait.

La familia Rubiaceae se caracteriza fitoquímicamente por su contenido en antraquinonas, consideradas como un importante grupo de productos naturales. Concretamente, *Plocama pendula* ha sido objeto de numerosos estudios en los que se han obtenido varias antraquinonas, triterpenos, naftoquinonas, lignanos y cumarinas de raíces naturales y transformadas de esta especie (**Fraga et al., 2009, 2011**). Debido a su gran contenido en antraquinonas muchas especies de esta familia se han utilizado desde antiguo como fuente de tintes naturales. Algunas de las antraquinonas aisladas de esta familia muestran también interesantes actividades in vitro: antimicrobiana, antifúngica, hipotensiva, analgésica, antimalárica, antioxidante, antialimentaria, antileucémica y mutagénica (**Quintana, 2006**).

Entre otros usos y aplicaciones del Balo también destacan los relacionados con su madera, la cual destaca por su resistencia y elasticidad. Esto justifica su uso en la elaboración de todo tipo de objetos de cestería. Se ha usado también como planta forrajera, pero transmite un mal sabor a la leche, lo que hace que se destine sólo a la alimentación de conejos y, sólo en último recurso para las cabras (**Marrero et al., 1999**).

### 1.2 Hongos endófitos.

Los hongos endófitos son un grupo de microorganismos, de enorme diversidad biológica, que viven en las plantas durante al menos una parte de su ciclo de vida sin causar ninguna manifestación visible de la enfermedad (**Bacon and White, 2000**). Por lo tanto, se trata de una asociación planta-microbio única de costo-beneficio definida

por "ubicación" que es transitoriamente asintomática, discreta y establecida enteramente dentro de los tejidos vivos de la planta huésped (**Kusari and Spiteller, 2012**). Durante esta asociación, ninguno de los organismos que interactúan se perjudica perceptiblemente, y los beneficios individuales dependen de los mismos.

Desde que los hongos endófitos fueron descritos por primera vez en el Darnel (*Lolium temulentum*) (**Freeman, 1904**), han sido aislados de tejidos de diferentes especies vegetales, y hasta la fecha, se ha encontrado que todas las especies vegetales estudiadas albergan al menos un endófito. Concretamente, los taxones de hongos que se han reportado como endófitos de diferentes especies de plantas incluyen Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota (**Carvalho et al., 2012**).

### **1.2.1 Relación endófito-huésped.**

A lo largo de los años son diversas las teorías que se han expuesto para explicar la relación entre los hongos endófitos y las plantas. Inicialmente se propuso la hipótesis de "antagonismo equilibrado" (**Schulz et al., 1999**), la cual determina que la colonización asintomática es un equilibrio de antagonismos entre el huésped y el endófito. Sin embargo, estudios recientes revelan que la interacción planta-endófito podría no ser sólo el equilibrio entre la virulencia y la defensa, sino una interacción mucho más compleja y controlada.

Como consecuencia de la interacción que se establece entre el endófito y la planta, se ha observado efectos que mejoran la adaptación de la planta al ecosistema en el que habita al aumentar su tolerancia al estrés, a los cambios de temperatura y salinidad, y a su resistencia frente a las enfermedades, bacterias, nematodos, herbívoros, insectos y hongos patógenos. Además, se sabe que la presencia de hongos endófitos en las plantas disminuye la vulnerabilidad de éstas frente a plagas agrícolas. También pueden aumentar la aptitud del huésped y las habilidades competitivas aumentando la germinación y la tasa de crecimiento o mejorando la absorción de elementos nutricionales por parte del huésped (**Aly et al., 2011**).

### **1.2.2 Potencial biotecnológico.**

**Síntesis de metabolitos secundarios:**



Muchos de estos compuestos pueden usarse directa o indirectamente como agentes terapéuticos frente a numerosas enfermedades (**Kusari et al., 2012**). La mayoría de las sustancias novedosas mostraron actividades antimicrobianas, anti-insectos, antioxidantes, anticancerosas y antineoplásicas, citotoxicidad y otras importantes funciones biológicas (**Zheng et al., 2016**).

#### **Agentes promotores del crecimiento vegetal:**

Los hongos endofíticos poseen muchas propiedades que podrían beneficiar el crecimiento de las plantas. Concretamente, los mecanismos investigados para el crecimiento de la planta incluyen la producción de agentes de control biológico, fitohormonas (ácido indolacético, giberelinas, citoquinas, etc.), entre otros. (**Zheng et al., 2016**).

#### **Producción de enzimas:**

Los hongos endofíticos son importantes productores de enzimas y tienen una alta capacidad para la producción de enzimas extracelulares tales como celulasas, quitinasas y demás enzimas catabólicas (**Zheng et al., 2016**). Se trata de importantes catalizadores biológicos usados ampliamente en la producción industrial y agrícola (**Suryanarayanan et al., 2012**).

#### **Fitorremediación/ biorremediación:**

Estudios recientes determinan que los hongos endófitos poseen muchos sistemas que pueden descomponer compuestos complejos, degradar contaminantes químicos y efectuar la bioabsorción de metales pesados (**Li et al. 2012c**).

Concretamente, en los últimos años se ha investigado la capacidad de los microorganismos endófitos para reducir la toxicidad de los metales a las plantas y así mejorar la eficiencia en el proceso de fitorremediación (**Deng et al., 2016**).

#### **Actividad antimicrobiana / anticancerígena**

Se ha determinado que los hongos endófitos de plantas medicinales muestran actividades antimicrobianas de amplio espectro y bioactividades citotóxicas (antitumorales). En definitiva, destacan como una fuente prometedora de nuevos



compuestos con actividad anticancerígena o como una fuente alternativa de compuestos originalmente aislados de plantas superiores (Zheng et al., 2016).

### **Biotransformación / biosíntesis.**

La biotransformación puede definirse como el uso de sistemas biológicos para producir cambios químicos en compuestos que no son sus sustratos naturales. Estudios recientes determinan que los hongos endófitos juegan un papel importante en este tipo de procesos (Wang et al., 2011).

## **2. Objetivos.**

### **2.1 General.**

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la diversidad de hongos endófitos asociados a la especie *Plocama pendula* (Balo), recogida en tres localizaciones geográficas diferentes dentro de la isla de Tenerife.

### **2.2 Específicos.**

- ❖ Aislar hongos endófitos del tallo, hojas y diferentes tipos de ramas de la especie *Plocama pendula*, recolectada en tres localidades diferentes.
- ❖ Identificar a través de microscopía óptica y técnicas moleculares los aislados obtenidos.
- ❖ Determinar la actividad antagónica frente a diferentes hongos fitopatógenos.
- ❖ Analizar la biodiversidad de las especies aisladas.
- ❖ Conservar las cepas aisladas para futuros trabajos de investigación.

## **3. Material y métodos.**

### **3.1 Obtención y aislamiento de los hongos endófitos.**

#### **3.1.1 Recolección del material vegetal.**

El material vegetal fue recolectado en tres localizaciones diferentes dentro de la isla de Tenerife: **Malpaís de Güimar y Valle de San Lorenzo**, caracterizadas por una

menor altitud y **Arafo**, de mayor altitud, situada en el límite superior del ecosistema basal de la isla, entre el matorral costero y el Monteverde .

Por lo tanto, basándonos en el desarrollo que adquieren las especies vegetales dominantes (fisionomía de la comunidad), podríamos decir que estas localizaciones están dentro del ecosistema denominado como **matorral costero**, el cual se extiende desde el nivel del mar hasta unos 300-400 metros a barlovento (norte) y hasta unos 800-1000 metros a sotavento (sur). Su limitación en biomasa se debe al estrés hídrico que han de soportar. Ello le confiere un aspecto característico de vegetación de desiertos, dominada por tabaibas, cardones, ahulagas y **balos**. (F. Aguilera et al., 1993).

La recolección del material vegetal se llevó a cabo durante los meses de Marzo y Abril del 2017, y de cada una de las localizaciones se recogieron muestras de tallo, ramas y hojas (**Tabla 1**), las cuales se metieron en bolsas debidamente etiquetadas y se llevaron al laboratorio, donde se conservaron en nevera para su posterior esterilización y obtención de los explantos.

Localización	ID	Latitud	Longitud	Altitud	Tª media anual	Precipitaciones
Malpaís de Güimar	G	28º 19' 24.456" N	16º 22' 7.28" W	49 m	18.9°C	361mm
Arafo	A	28º 21' 7.909" N	16º 24' 50.882" W	535 m	17.5°C	446mm
Valle San Lorenzo	SL	28º 5.01' 0" N	16º 38.604' 0" W	514m	22.5°C	150mm

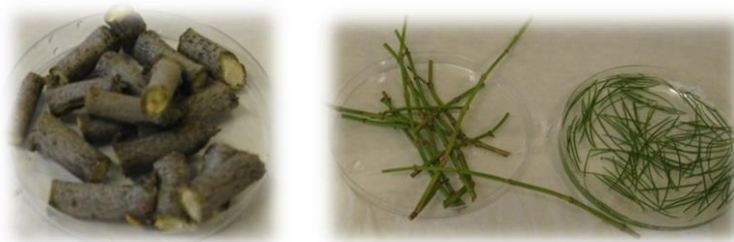
**Tabla 1.** Datos geográficos y climáticos de los tres sitios de recolección.

### 3.1.2 Preparación y esterilización del material vegetal.

El medio de cultivo, el papel de filtro, agua destilada y utensilios, como pinzas, bisturí y asas de siembra, utilizados para la obtención de los explantos, fueron esterilizados en un autoclave a una temperatura de 120°C y 1,2 atmósferas de presión, durante 30 minutos.

El material vegetal se separó en tallo, hojas y ramas, primarias y secundarias (**Figura 2**). Posteriormente, con ayuda de un bisturí, se retiró de manera superficial la

parte lignificada del tallo y rama 1º, para posteriormente realizar un primer lavado con agua destilada (**Figura 3**).

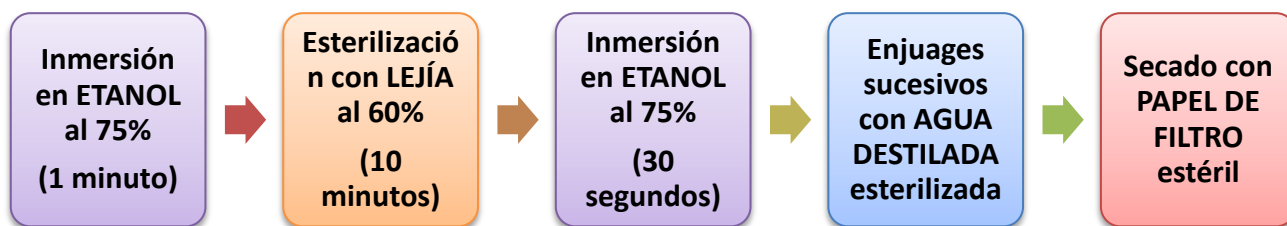


**Fig 2:** Material vegetal estudiado. (Izq. a drcha: tallo, rama 2º y hojas).



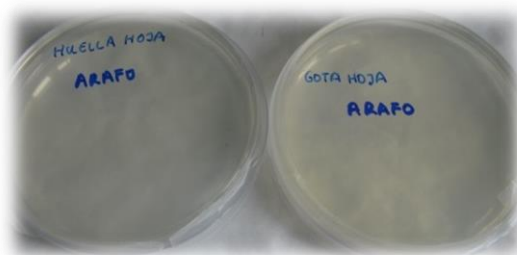
**Fig 3:** Tratamiento pre-esterilización rama 1º.

Una vez dentro de la cámara de flujo laminar, se siguió el siguiente protocolo de esterilización para el material vegetal (**Giménez., 2006**).



Antes de la siembra y con ayuda de un bisturí estéril, los bordes de las hojas y el tallo y las ramas se volvieron a raspar para quitar posibles restos de material lignificado.

La eficacia del tratamiento de esterilización se comprobó realizando una impresión de las huellas de los tejidos vegetales y la inoculación del agua del último lavado en placas de Petri con el mismo medio usado para la siembra de los explantos (**Figura 4**).

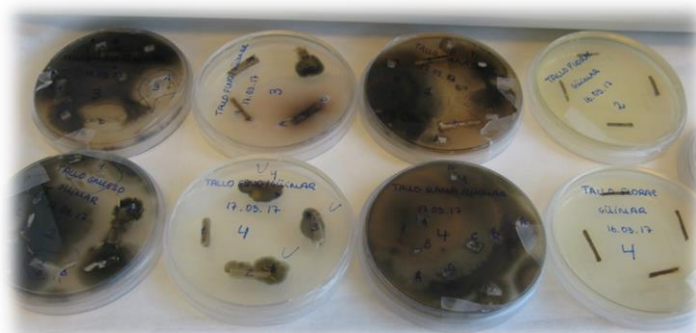


**Fig 4:** Comprobación de la eficacia del protocolo de esterilización.

### 3.1.3 Siembra de los explantos.

Para la siembra de los explantos y el crecimiento de los endófitos se utilizó como medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar) con 50 mg/L de cloranfenicol, para evitar el crecimiento bacteriano. Tras la esterilización, el medio fue vertido caliente en las placas, en un ambiente aséptico.

En cada una de las placas se sembraron 4 explantos. Se realizaron 4 repeticiones para cada uno de ellos (hoja, tallo primario, secundario y terciario) y para cada una de las localizaciones. Para la identificación de las placas se utilizó el siguiente código: localización, órgano y número de repetición. Por ejemplo: A/H/1 (Arafo/ Hoja/ Placa número 1). Posteriormente, se incubaron en la cámara de cultivo con luz constante y a 26°C. Las placas fueron examinadas periódicamente, y a medida que los hongos endófitos fueron creciendo, se repicaron en placas pequeñas, para la obtención de cultivos puros. En este caso, la identificación de las placas presentaba el siguiente código: localización, órgano, número de repetición y número de explanto (**Figura 5**).



**Fig 5:** Siembra de los explantos.

## 3.2 Identificación de los aislados.

### 3.2.1 Identificación microscópica.

En primer lugar, los hongos endófitos obtenidos, se agruparon a partir de su parecido macroscópico, para posteriormente realizar observaciones microscópicas en fresco, con agua destilada, con el objetivo de hacer una primera identificación de los mismos a partir de características distintivas observadas en esporas, micelio y estructuras reproductoras.

### 3.2.2 Identificación molecular.

Se sembraron las cepas obtenidas en placas de Petri con PDA, para la obtención de cultivos frescos necesarios para llevar a cabo esta identificación. Posteriormente, fueron llevadas al servicio de secuenciación de la Universidad de La Laguna.

Tras extraer el DNA fúngico, se empleó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificar las muestras mediante primers específicos (ITS1, ITS4. Estos primers se han diseñado gracias al estudio del DNAr, permitiendo amplificar regiones concretas del mismo. Tras la secuenciación del ADN fúngico, los resultados se han comparado con los de la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), considerando válida la identificación a nivel de especie cuando el porcentaje de homología entre la secuencia obtenida y la existente en GenBank ha sido igual o superior al 97%.

**Figura 6:** Columnas de izq a drcha:  
Marcadores, DNA fúngico amplificado en  
muestras de hongos endófitos aislados en  
*Plocama pendula*.



## 3.3 Bioensayos de antagonismo.

El bioensayo de antagonismo es un método que se utiliza para determinar si los hongos endófitos presentan actividad inhibitoria del crecimiento de diferentes fitopatógenos seleccionados como organismos diana.

### 3.3.1 Hongos fitopatógenos.

Para la realización del bioensayo de antagonismo se eligieron como patógenos diana, las especies *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Botrytis cinerea* (de Bary) Whetzel., y *Fusarium oxysporum* Schldtl.

Las tres especies pertenecen al filo Ascomycota y son conocidas por ocasionar daños severos en los vegetales (Agrios., 2005).

El patógeno *Alternaria sp.* es un hongo saprófito que tiene un micelio de color oscuro. Los conidios son grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares y en forma de pera y presentan sepias tanto transversales como longitudinales. Además, se desprenden con facilidad y son diseminados por las corrientes de aire (Agrios., 2005).

Por lo común, las enfermedades causadas por Alternaría aparecen en forma de manchas y tizones foliares, pero pueden ocasionar también el ahogamiento de plántulas, pudriciones del cuello, así como pudriciones de los frutos y tubérculos (Agrios., 2005).

El patógeno *Botrytis sp.* produce abundante micelio gris y varios conidioforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento (Agrios., 2005).

*Botrytis* causa los "mohos grises" o las "pudriciones por el moho gris" de frutos y hortalizas. Los mohos grises ocasionan anualmente pérdidas considerables en muchas hortalizas y frutos carnosos almacenados, particularmente en peras, manzanas, fresas, cítricos, tomates y cebollas. (Agrios., 2005).

*Fusarium* es un patógeno que produce un micelio cuya coloración puede variar entre color crema o rosa pálido. Produce tres tipos de esporas asexuales: microconidios, macroconidios y las clamidiosporas (Agrios.,2005).

*Fusarium* se caracteriza por ser uno de los tres géneros que producen marchitamientos vasculares, concretamente, produce los llamados "mohos amarillos o rosados" de plantas de ornato y hortalizas de post-cosecha (Agrios., 2005).

### 3.3.2 Preparación del bioensayo de antagonismo.

Se extrajeron, con ayuda de un sacabocado estéril, fragmentos pertenecientes a cada una de las cepas obtenidas de hongos endófitos y de los fitopatógenos descritos en el apartado anterior, y se sembraron en placas de Petri, con medio PDA, a una distancia de 4 cm entre ellos. Posteriormente, se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para los hongos endófitos.

### 3.4 Conservación.

La conservación de las cepas obtenidas de hongos endófitos se llevó de la siguiente manera:

- ❖ **Congelación:** una vez que las colonias de los hongos aislados habían crecido, se tomaron 4-5 fragmentos por placa y se transfirieron a tubos eppendorff estériles con 1 ml de glicerol al 18% para su conservación a -80°C.
- ❖ **Conservación en aceite mineral:** en este caso se usaron microtubos con 1 ml de parafina líquida estéril, que se almacenaron en la nevera a 4°C.

### 3.5 Análisis de la diversidad de los hongos endófitos.

#### 3.5.1 Índice de diversidad de Simpson.

El índice de diversidad de Simpson permite medir la riqueza de los organismos de un hábitat, tiene en cuenta las especies que están mejor representadas (dominan) sin tener en cuenta las demás. Asume valores entre 0 y 1 (**Jin et al., 2013**). Se trata de una de las medidas de diversidad más significativas disponibles. En esencia, captura la varianza de la distribución de abundancia de especies. Así, el valor de la medida aumentará a medida que el conjunto se vuelva más uniforme (**Magurran, 2004**).

La forma del índice apropiado para una comunidad finita es:

$$D = \sum_{i=1}^s \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)}; \text{ Dónde: } S \text{ es el número de especies; } N \text{ es el total de}$$

organismos presentes;  $n$  es el número de ejemplares por especie (**Magurran, 2004**).



### 3.5.2 Frecuencia de colonización.

$$F = \frac{N_{col}}{N_{total}} \times 100;$$
 Dónde: **N col.** representa el número de segmentos colonizados por cada hongo; **N total** es el número total de segmentos (Suryanarayanan et al., 2001).

### 3.5.3 Índice de Margalef.

El índice de Margalef mide la riqueza de especies y es muy sensible al tamaño de la muestra, aunque intenta compensar los efectos del muestreo (Magurran, 2004).

$$D = \frac{S-1}{\ln(N)};$$
 Dónde: S es el número de especies; N es el número total de organismos presentes (Kusari et al., 2013).

### 3.5.4 Coeficiente de similitud de Jaccard.

Este coeficiente se utilizó para describir la afinidad taxonómica de los hongos endófitos entre las diferentes muestras, es decir, para medir la similitud entre pares de muestras. El índice oscila entre 0 (sin taxa compartidos) y 1 (todos los taxones compartidos) (Arnold et al., 2000).

$$I_j = \frac{c}{(a+b)-c}$$
 Dónde: a representa el número de especies presentes en el sitio a; b es el número de especies presentes en el sitio b; c es el número de especies presentes en a y b.

## 4. Resultados y discusión.

### 4.1. Aislamiento de los endófitos.

A partir de la siembra de los explantos, se aislaron los hongos endófitos a medida que fueron creciendo en las placas de PDA. Concretamente, se pudo observar crecimiento tras cuatro días de incubación, distribuidos de manera diferencial a partir de los segmentos de hojas, ramas y tallo, que se sembraron de la planta. En total se obtuvieron 189 aislados pertenecientes a 20 especies.

A partir de los resultados mostrados en la tabla 2, podemos ver que el número de especies en los diferentes lugares de muestreo está entre 9-16, mostrando una mayor variedad de hongos endófitos la localización de Güimar y una menor la de San Lorenzo.

	ARAFO					GÜIMAR					SAN LORENZO				
	T	1º	2º	H	TOTAL	T	1º	2º	H	TOTAL	T	1º	2º	H	TOTAL
<b>Aislados</b>	15	17	27	0	59	21	11	21	23	76	18	18	7	7	50
<b>Especies</b>	3	4	10	0	<b>12</b>	5	2	8	8	<b>16</b>	3	6	4	3	<b>9</b>

**Tabla 2:** Aislamiento de los endófitos. (T- tallo; 1º- rama primaria; 2º- rama secundaria; H-hoja).

De acuerdo con estudios realizados sobre la distribución de los hongos endófitos en las especies vegetales, se ha determinado que la tasa de colonización es superior en el tallo y en las ramas, que en las hojas (**Zheng et al., 2015**). En este trabajo se confirma en cierta medida este hecho, observando un mayor número de especies aisladas en el tallo y en las ramas con respecto a las hojas.


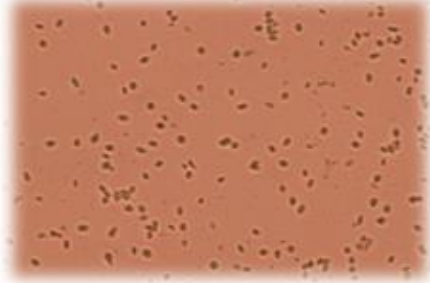
Como podemos ver en la tabla 2, el tallo (más cercano a la raíz) es el que en general, presenta una mayor biodiversidad de hongos endófitos, lo cual determina que la posible entrada de los hongos a la planta se establece a través de la raíz. Este hecho coincide con estudios recientes que determinan que los hongos transmitidos por el suelo son típicamente mucho más frecuentes y diversificados que los que infectan los tejidos de las plantas aéreas (**Ghimire et al., 2011**). Otra de las razones es que las principales fuentes de sustrato fácilmente accesible son las raíces, las cuales se pueden considerar como un medio relativamente estable y adecuado para cualquier especie fúngica (**Garbeva et al., 2004**).


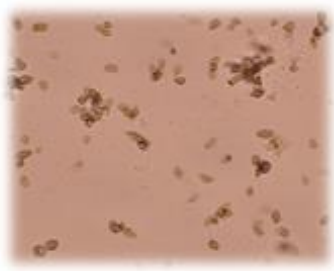
Otro dato excepcional que podemos observar en la tabla 2, es que en la población de Arafo no se desarrolló ningún aislado en las hojas. Este hecho, lo podemos relacionar con un estudio de (**Gamboa-Gaitán et al., 2002**), en el que se determina que hay una fuerte relación lineal entre el tamaño de los fragmentos


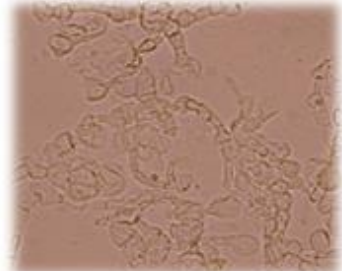
sembrados y el número de hongos aislados, es decir, que la reducción del tamaño y el aumento del número de fragmentos de hoja aumenta el número de especies aisladas. Esta estrategia hubiera ayudado a estimar los valores reales de la diversidad de hongos endófitos en las hojas en esta población.


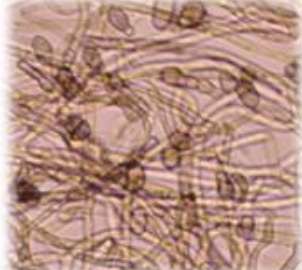
#### 4.2 Identificación y descripción de las cepas fúngicas.



El micelio y las estructuras reproductoras observadas en las preparaciones microscópicas de las cepas no nos permitió su identificación. En vista de estos resultados, se intentó realizar un análisis a nivel molecular, pero en la mayoría de los casos la comparación de las secuencias amplificadas por PCR con las depositadas en la base de datos del GenBank no mostró un porcentaje de similitud muy bajo o un porcentaje bajo de la longitud de la región ITS. En estudios posteriores se volverá a repetir este análisis para completar su identificación.

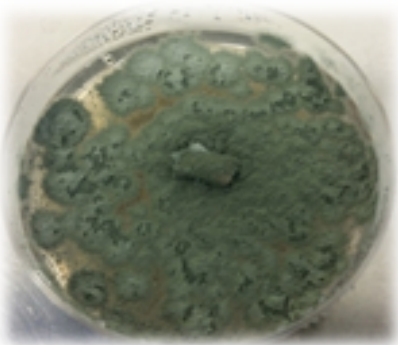
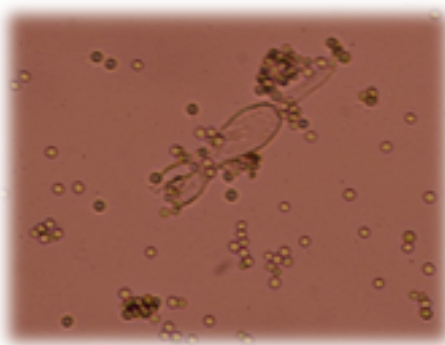
Identificación del hongo						
Cepa	Accesion	Max. score	Total score	Query cover	Evalue	Max. ident.
P1	GU056017.1	56.5	56.5	3%	0.001	100%
Clasificación taxonómica						
Reino		Filo		Orden		Especie
Fungi		Ascomycota		Xylariales		<i>Uncultured Xylariales</i>
Características macroscópicas				Características microscópicas		
						
La colonia presenta un aspecto brillante y una coloración rosada en la superficie y en el reverso. Tiene un crecimiento lento y una superficie lisa y cremosa.				Microscópicamente se observaron principalmente conidios de forma redondeada y de color amarillento. El micelio está compuesto por hifas septadas y poco ramificadas.		

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
<b>P2</b>	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Una colonia de color marrón-verde oscuro tanto en la superficie como en el reverso. Presenta una superficie con aspecto aterciopelado.	En el microscópico se aprecia el micelio de color pardo con pocas ramificaciones y unas hifas tabicadas. Los conidios tienen forma ovalada con los ápices apiculados, unas paredes gruesas, y del mismo color que el micelio.

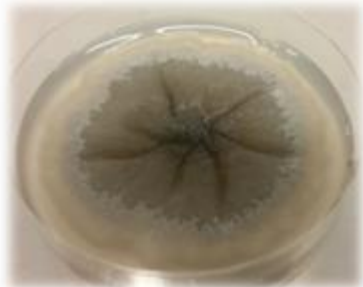

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
<b>P3</b>	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Se trata de una colonia de aspecto butiráceo, consistencia cremosa y con superficie plana y de color blanquecino. En el reverso, aparece el mismo color en el centro, y los bordes se muestran más claros.	En la preparación microscópica, se puede ver un micelio de aspecto hialino, con hifas tabicadas y anchas. Posee conidios globosos e hialinos.

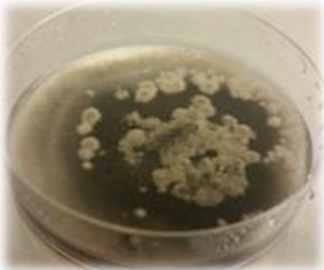
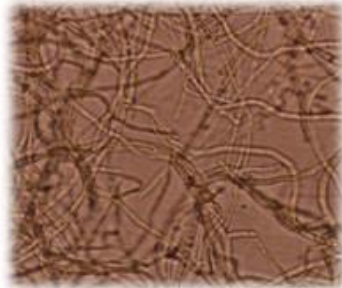
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
<b>P4</b>	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Macroscópicamente se trata de una colonia de aspecto algodonoso, de color blanco-verdoso en la superficie y verde oscuro en el reverso.	Microscópicamente, el micelio es cenocítico, es decir, presenta hifas sin septos y de aspecto hialino. Los conidios, multicelulares, están pigmentados de color marrón y presenta septos transversales.

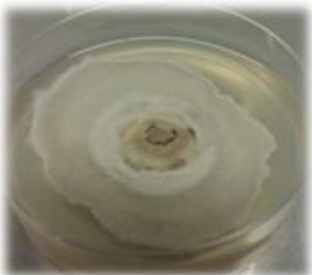
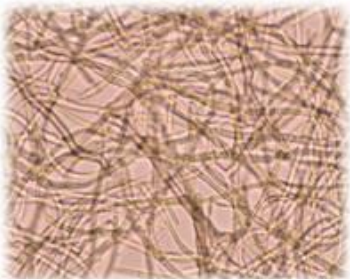
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P5	Sin identificar ( <i>Aspergillus</i> )
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia aterciopelada y con pliegues, de crecimiento rápido y color verdoso. A medida que va creciendo provoca fracturas y transforma, a un color amarillento, el medio de PDA.	Principalmente, a nivel microscópico se observan conidios unicelulares y redondos, que forman hileras tanto agrupadas como solitarias.

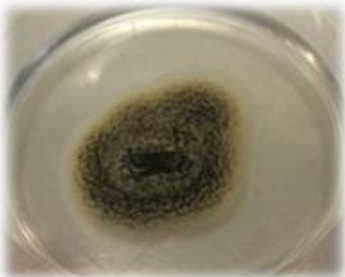

Identificación del hongo						
Cepa	Accesion	Max. score	Total score	Query cover	Evalue	Max. ident.
P6	GU183163.1	52.4	262	24%	0.015	97%
Clasificación taxonómica						
Reino	Filo	Orden	Especie			
Fungi	Ascomycota	Eurotiales	<i>Aspergillus flavus</i>			
Características macroscópicas			Características microscópicas			
						
Colonia de crecimiento rápido. Comienza con una tonalidad más débil y algodonosa, para luego tomar a una tonalidad verdosa y pulverulenta. En el reverso presenta una coloración amarillenta.			Microscópicamente se puede observar un micelio hialino. Los conidióforos forman cabezuelas con una vesícula apical provista de fálides productoras de conidios. Los conidios son unicelulares y redondos. Habitualmente forman hileras, que pueden aparecer agrupadas o solitarias.			

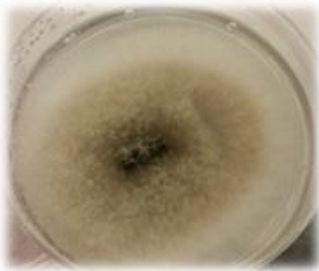
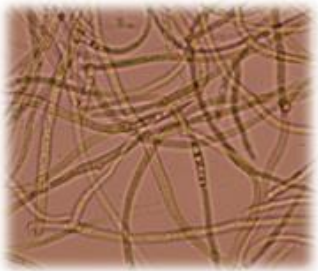


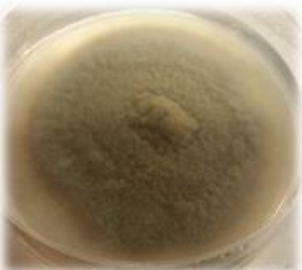
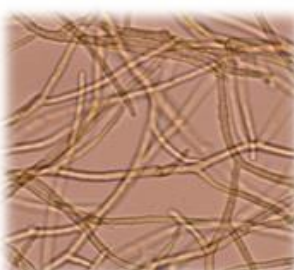
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P7	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de crecimiento lento. Presenta elevaciones umbilicadas, con bordes estriados, irregulares y con una coloración grisácea, la cual contrasta con la tonalidad marrón de la parte central.	Microscópicamente presenta un micelio hialino con hifas septadas y ligeramente ramificado. Los conidios son unicelulares, de aspecto hialino y redondeados.

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P8	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Se trata de una colonia de rápido desarrollo, con micelio algodonoso que en la superficie presenta un color gris, y por debajo de esta capa toma una tonalidad verde-oscura. El reverso es del mismo color.	En las preparaciones microscópicas se pudo observar un micelio hialino, sin septos y muy ramificado. No se ha podido observar ninguna estructura reproductora.


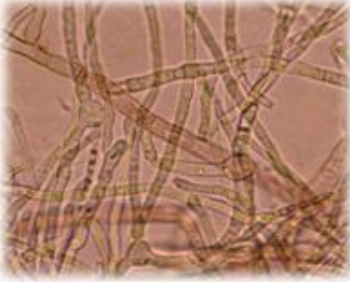
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P9	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia plana que macroscópicamente presenta un aspecto aterciopelado. A medida que va creciendo forma zonas con distintas tonalidades de blanco.	Microscópicamente se puede apreciar un micelio de color marrón, con hifas sin septos, en cuyo interior se pueden observar multitud de vesículas. En este caso, no se ha podido observar ninguna estructura reproductora.

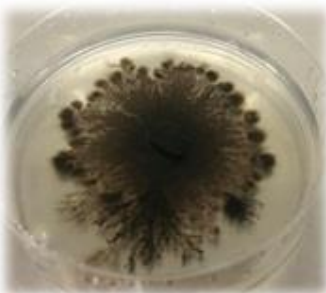
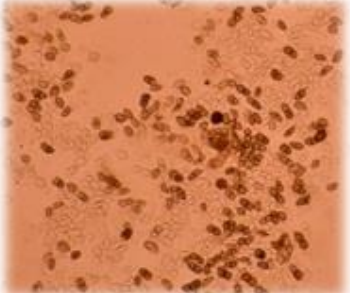
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P10	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
La colonia tiene un crecimiento lento, con aspecto granuloso y una coloración marrón-amarillenta, con un borde de aspecto algodonoso y de color blanco. Los cuerpos fructíferos parecen estar agrupados en toda la colonia.	En el microscopio se visualiza el micelio tabicado, con una coloración marrón. Además, se pueden apreciar los conidios unicelulares, translúcidos y con forma ovalada.

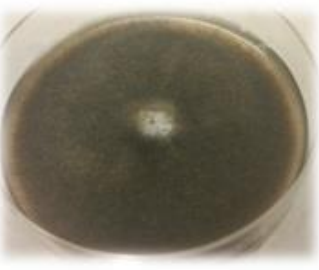
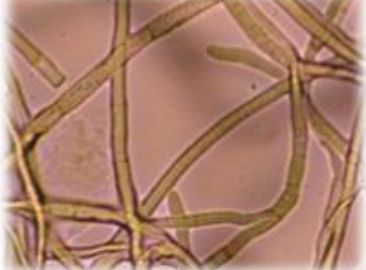
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P11	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Macroscópicamente se trata de una colonia de aspecto algodonoso, de color crema en la parte central. Rápidamente, a medida que va creciendo presenta los bordes de color blanco.	Microscópicamente, presenta un micelio con hifas de aspecto translúcido y de color amarillento. Estas hifas son poco ramificadas y presentan vesículas en su interior.


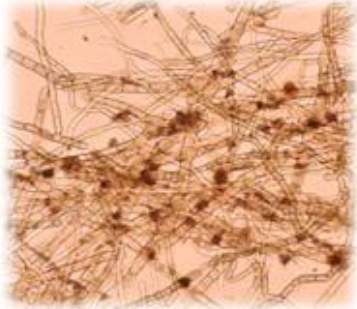
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P12	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Se trata de una colonia de aspecto algodonoso, con elevaciones, de color marrón-verdoso en la superficie, y tonalidad color crema en la parte inferior.	Presenta un micelio con hifas de aspecto translúcido, con un ligero color marrón y poco ramificadas. En este caso no se ha podido observar ninguna estructura reproductora.



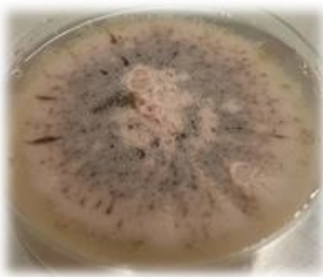
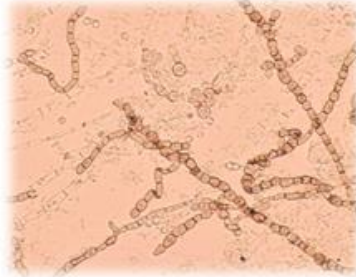
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P13	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de aspecto butiráceo, presenta elevaciones y a medida que va creciendo tinte el medio a un color marrón oscuro.	Micelio formado por hifas de aspecto translúcido, poco ramificadas, con vesículas en su interior y ligeramente pardas. Se pueden observar conidios de aspecto globoso.


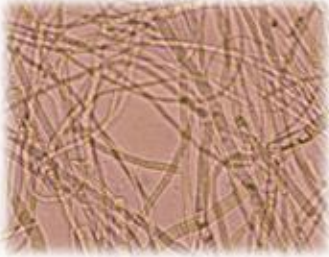
Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P14	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de aspecto butiráceo y pulverulento. Los cuerpos fructíferos del hongo parecen estar agrupados en los extremos de la colonia.	En la preparación se observaron principalmente los conidios, de color pardo y septados.



Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P15	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Se trata de una colonia de crecimiento lento. El micelio tiene aspecto aterciopelado y con coloración oscura, tanto en la superficie como en el reverso.	Posee un micelio de color pardo y aspecto translúcido, sin septos y poco ramificado. En este caso no se ha podido observar ninguna estructura reproductora.

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
<b>P16</b>	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de aspecto algodonoso, a medida que va creciendo crea diferentes zonas, siendo verde oscura en la parte inferior y verde clara la superior.	El micelio tiene una tonalidad parda y está compuesto por hifas tabicadas. También se pueden observar los conidios, de aspecto redondeado y con una coloración mucho más intensa.

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
<b>P17</b>	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de crecimiento lento, de aspecto aterciopelado, que a medida que va creciendo va diferenciando zonas de diferentes tonalidades.	Se visualiza el micelio tabicado, con una coloración marrón claro. Además, se pueden apreciar los conidios unicelulares, translúcidos y con forma ovalada.

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
<b>P18</b>	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de aspecto mucilaginoso. Presenta un color rosáceo e impregnaciones de color negro que presumiblemente sean los cuerpos fructíferos del hongo	Se puede observar el conidióforo de color pardo, monoverticilado, de los cuales nacen los conidios, de forma redondeada y con una coloración más débil.

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P19	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia con micelio oscuro, se pueden observar hifas de crecimiento aéreo.	Micelio con hifas poco ramificadas, de aspecto translúcido, sin septos y con una ligera coloración parda.

Identificación del hongo	
Cepa	Clasificación taxonómica
P20	Sin identificar
Características macroscópicas	Características microscópicas
	
Colonia de crecimiento lento, algodonosa y de color blanco. A medida que iba va creciendo torna el medio PDA a un color amarillo.	Micelio con pocas ramificaciones e hifas tabicadas.

### 4.3 Análisis estadístico.

	ARAFO	GÜIMAR	SAN LORENZO	TODOS
I. SIMPSON	0.23	0.09	0.27	0.10
I.MARGALEF	3.16	3.46	2.00	3.6

**Tabla 3:** Diversidad y riqueza de los hongos endófitos aislados.

El **índice de Simpson** (tabla 3) determina en general una distribución bastante desigual entre las poblaciones muestreadas, es decir, hay pocas especies dominantes y muchas especies representadas en baja frecuencias. Esto coincide con estudios que



determinan que las comunidades de hongos, incluidas las de endófitos, siguen una distribución de log-normal, es decir, pocas especies abundantes y muchas especies raras, al igual que sucede con las comunidades de macroorganismos (**Gamboa-Gaitán., 2006**).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los valores de diversidad (índice de Simpson) mostrados para la población de San Lorenzo, determinan que se trata de un conjunto más uniforme, aunque hay que decir que hay menos especies de hongos endófitos aislados en esta población, lo cual puede alterar el resultado en comparación con las restantes poblaciones.

Por otro lado, **el índice de Margalef** (tabla 3), nos informa que la riqueza de las especies por cada población. Este índice se establece entre valores de 2-3. Concretamente, los valores inferiores a 2 determinan una baja biodiversidad, mientras que los superiores a 5 van a determinar una alta biodiversidad. Al estar estos valores en un punto más cercano a 2 que a 5, podríamos decir que tenemos en las diferentes muestras baja biodiversidad de hongos endófitos aislados, lo cual coincide con lo dicho anteriormente.

	PLANTA	TALLO	RAMA 1º	RAMA 2º	HOJA
P1	17,10	3,51	37,04	15,38	10,00
P2	9,33	1,75	25,93	3,85	3,33
P3	3,63	1,75		11,54	
P4	16,06	26,32	5,56	11,54	23,33
P5	3,11	3,51		3,85	6,67
P6	5,70	8,77		7,69	6,67
P7	3,11			11,54	
P8	2,07	7,02			
P9	3,11	7,02			6,67
P10	3,63	5,26	7,41		
P11	4,15	5,26	5,56		6,67
P12	0,52	1,75			
P13	1,04				6,67
P14	2,07	5,26	1,85		
P15	1,55				10,00
P16	1,55				10,00
P17	3,63	7,02	5,56		
P18	0,52	1,75			
P19	15,54	12,28	7,41	30,77	10,00
P20	0,52	1,75			

**Tabla 4:** Frecuencias de colonización en los diferentes órganos de *Plocama pendula*.

Por otro lado, tal y como podemos ver en la tabla 4, la **cepa P1**, aislada en la población de Güimar y de Arafo, es una de las cepas predominantes, la cual presenta una alta frecuencia tanto en la rama 1º (37.04%) y en la rama 2º (15.38%).

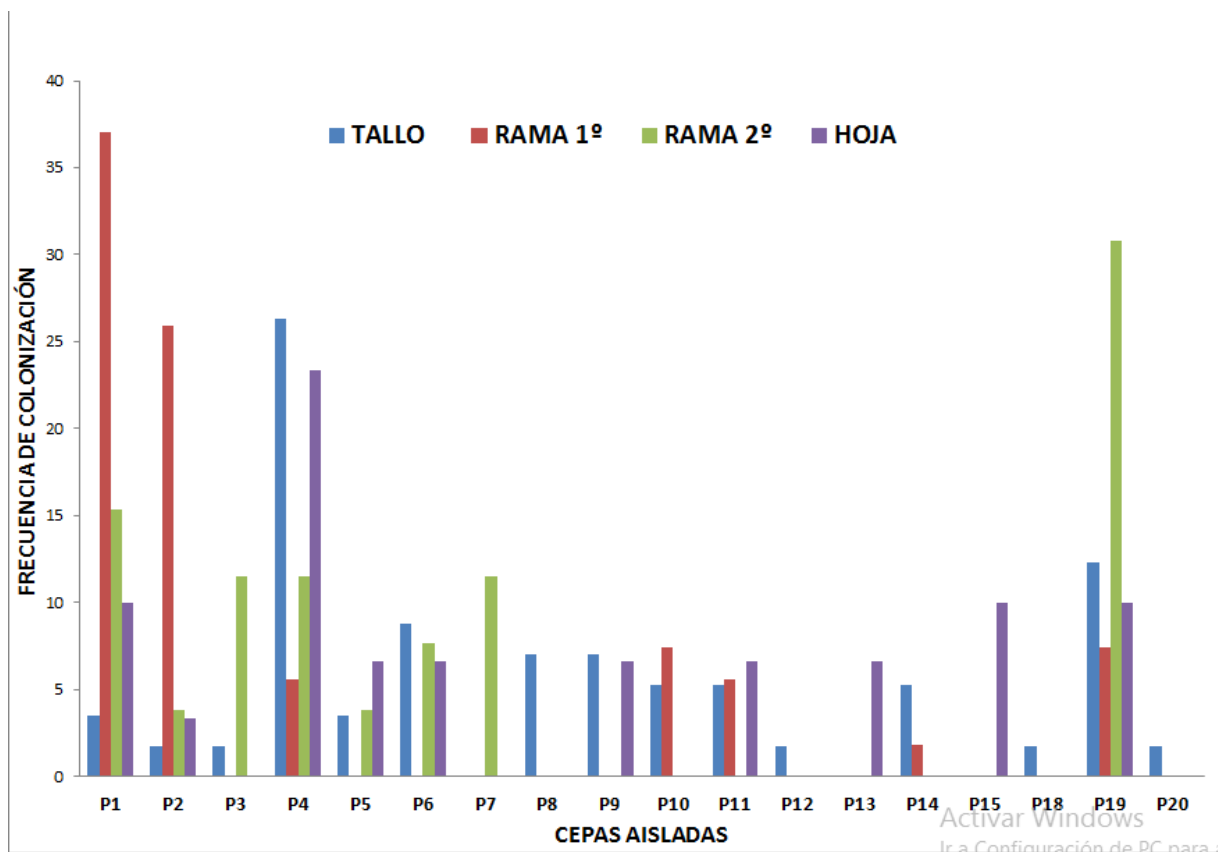
Otra de las cepas predominantes es la **P4**, la cual fue aislada en las tres poblaciones muestreadas. Ésta presenta una alta frecuencia en el tallo (26.32%), en las hojas (23.33%) y en la rama 2º (11.54%).

También destaca la **cepa P19**, aislada en las poblaciones de Arafo y San Lorenzo, con un alto grado de representación en el tallo (12.28%) y la rama 2º (30.77%).

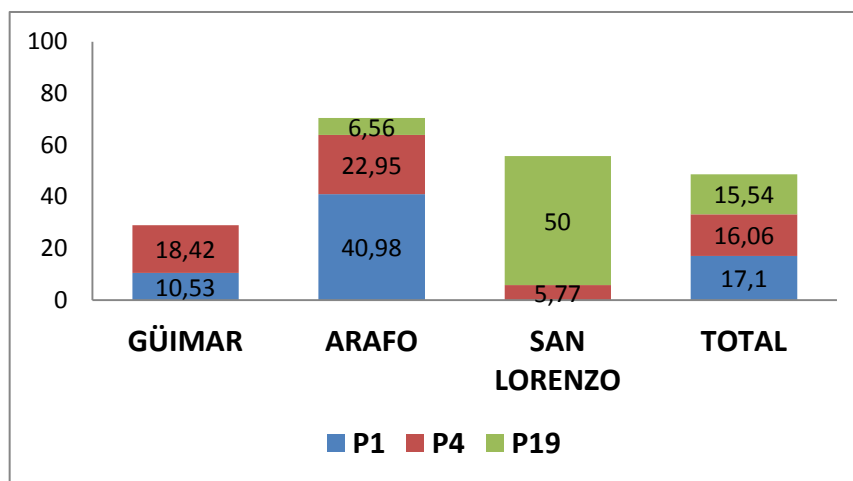
Otras especies que destacan son, la **cepa P2**, aislada en las tres poblaciones, con una alta frecuencia en la rama 1º (25.93%), la **cepa P7**, aislada en Güimar y San Lorenzo, con su mayor representación en la rama 2º (11,54%) y finalmente, la **cepa P3**, la cual aparece en una alta frecuencia en la rama 2º (11,54%).

Algunas de las especies aisladas se encuentran restringidas a un sólo hábitat y/o parte de la planta (Tabla 4), por lo que aparecen con una frecuencia muy inferior en comparación con las cepas citadas anteriormente.

Por otro lado, podemos ver una cierta preferencia de algunas cepas por determinados órganos (Tabla 4), como es la P7, que colonizó únicamente la rama 2º, las cepas P8, P17, P18 y P20 por el tallo, o la P26 por la rama 1º. Este hecho se ha descrito en otros estudios (**Gamboa-Gaitán., 2006**), en el que se ha observado la especificidad de la micoflora por determinados tejidos vegetales. Una de las ventajas que presenta dicha especificidad es permitir la coexistencia de muchas especies de endófitos sobre el mismo vegetal, minimizando la competencia entre ellos.



**Gráfico 1:** Distribución de las cepas en los diferentes órganos de la planta.



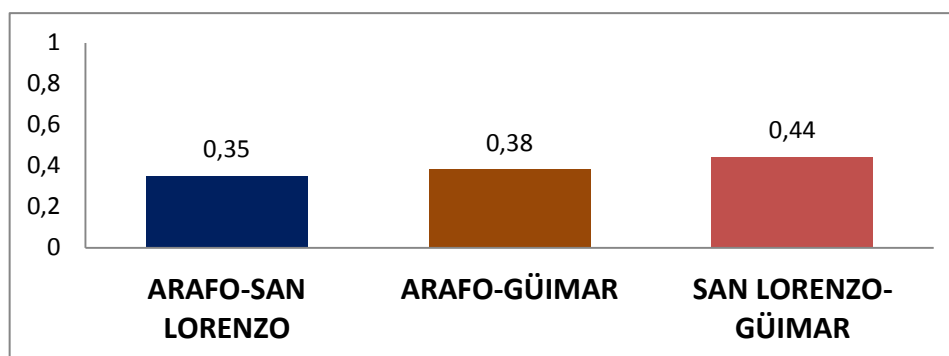
**Gráfico 2:** Endófitos predominantes en las diferentes áreas de muestreo.

A partir de los resultados observados en el gráfico 2, podemos ver que son tres hongos endófitos los dominantes en la totalidad de las poblaciones muestreadas, dado que poseen valores muy similares. De mayor a menor dominancia tenemos en primer lugar la **cepa P1**, la cual se desarrolló en todos los tejidos de la planta (hoja, tallo y ramas 1ª y 2ª) y se aisló de las poblaciones de Güimar y de Arafo. A continuación, le

sigue la **cepa P4**, que también se desarrolló en todos los tejidos de la planta y se aisló de las tres poblaciones muestreadas. Finalmente, la **cepa P19** también mostró una alta dominancia, la cual también aparece en todos los órganos de la planta y se aisló de las poblaciones de Arafo y San Lorenzo.

Si observamos los datos obtenidos por cada población podemos ver que en Güimar la cepa que domina es la **P4**, en Arafo la **P1** y en San Lorenzo la cepa **P19**.

Estos datos confirman lo dicho anteriormente, parece ser que las comunidades de hongos endófitos se caracterizan por ser altamente heterogéneas, con una alta variedad de especies aisladas que presentan una baja frecuencia y pocas especies dominantes.



**Gráfico 3:** Coeficiente de similitud de Jaccard entre las poblaciones.

La similitud entre las especies aisladas de las distintas poblaciones fue determinada con el coeficiente de similitud de Jaccard (Gráfico 3). Como podemos ver, la mayor similitud entre especies se establece entre la población de San Lorenzo y Güimar y la menor entre Arafo y San Lorenzo.

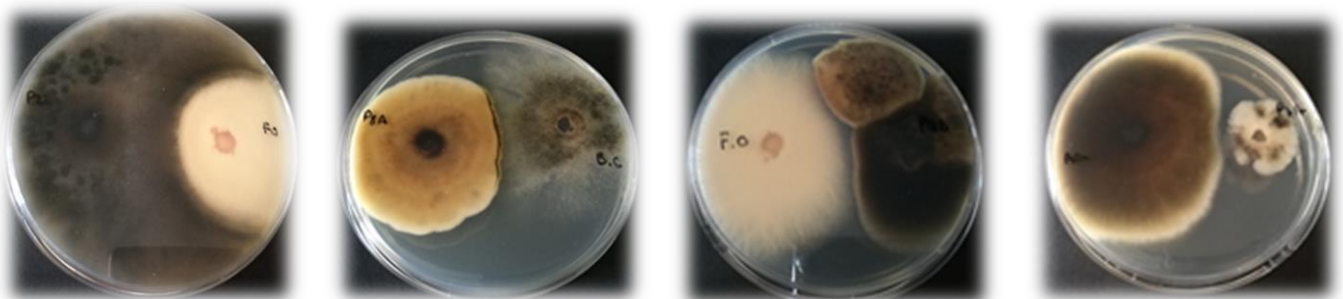
Estos resultados se pueden justificar teniendo en cuenta las características geográficas y ecológicas de las diferentes áreas de muestreo. Como dijimos anteriormente, Güimar y San Lorenzo se incluyen dentro del ecosistema denominado como matorral costero, área de menor altitud, con bajas precipitaciones y altos niveles de insolación, por lo que cabe esperar que compartan un mayor número de especies de hongos endófitos. Concretamente comparten siete cepas de hongos endófitos (P4, P5, P6, P7, P8, P10, P17) Además, hay estudios que afirman que las comunidades de



hongos endófitos pueden variar enormemente en una misma especie huésped en diferentes sitios, climas, estaciones y ambientes. Es decir, la composición de los microbiomas puede depender de múltiples factores, incluyendo el huésped vegetal, densidad de plantas, disponibilidad de nutrientes, condiciones ambientales e interacciones con microbiomas externos (por ejemplo, hongos del suelo y bacterias) (Porras-Alfaro et al., 2011).

### 4.3 Actividad antagónica:

La interpretación de los resultados se ha llevado a cabo siguiendo los criterios establecidos por Neville y Webster en 1995:



**Tabla 5:** Criterios de interpretación del bioensayo.

- ❖ no hay efecto.
- ❖ contacto con formación de barrera/ zona oscura.
- ❖ zona estrecha de inhibición (1-2 mm).
- ❖ inhibición a una distancia mayor de 2 mm.

Con lo que respecta a la actividad antagónica, podemos observar (tabla 6), que el patógeno *Botrytis cinerea*, es el más sensible frente a la hongos endófitos aislados en *Plocama pendula*. Concretamente, su crecimiento se vio inhibido por la cepa P3, P5, P7 y P20, presentando un halo de inhibición superior a los 2 mm. También la cepas P7 inhibió su crecimiento, pero con un menor efecto.

Por otro lado, podemos decir que las cepas P2, P4, P7, P8 y P20, fueron hongos endófitos que resultaron ser activos frente a las 3 dianas. Concretamente, podemos destacar la alta actividad presentada por la cepa P3 y P20 frente a *B. cinerea*, y de la P7

frente a *A. alternata*, presentando un halo de inhibición del crecimiento de más de 2 mm.

CEPAS	0: NO EFECTO			1: BARRERA OSCURA			2: IHN (1-2mm)			3: INH > 2mm		
	F.o	A. alt	B.cin	F.o	A. alt	B.cin	F.o	A. alt	B.cin	F.o	A. alt	B.cin
P2				1	1	1						
P3		0		1								3
P4					1	1	2					
P5	0	0										3
P6		0	0				2					
P7							2		2		3	
P8					1	1	2					
P9	0	0	0									
P11		0		1		1						
P19	0	0				1						
P20							2	2				3

**Tabla 6:** Resultados bioensayo de antagonismo.

## 5. Conclusiones.

- ❖ En este trabajo se ha demostrado que *Plocama pendula* presenta un ecosistema rico en especies endofíticas. De acuerdo con el índice de Simpson obtenido, los resultados muestran una distribución desigual, en la que tenemos pocas especies dominantes y muchas especies representadas en baja frecuencia.
- ❖ Las cepas dominantes han sido la P1, P4 y P19, con una alta distribución en todos los órganos de la planta que han sido muestreados (tallo, ramas y hojas).
- ❖ De todos los órganos estudiados, el tallo (más cercano a la raíz) parece ser la zona que mayor diversidad de hongos endófitos, lo cual determina la posible entrada de los hongos a la planta.

- ❖ Los hongos endófitos con mayor actividad antagónica han sido P2, P4, P7, P8 y P20, los cuales han sido activos frente a las 3 dianas. Por otro lado, el patógeno *Botrytis cinerea* fue el más sensible frente a los mismos.
- ❖ Finalmente, hay que tener en cuenta, que este estudio está basado en un solo muestreo, por lo que se basa en conclusiones que se han sacado a partir de los datos obtenidos y de la bibliografía consultada, por lo tanto, habría que ampliarlos y confirmarlos en futuros trabajos. No obstante, ha permitido ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad de hongos endófitos presentes en la especie *Plocama pendula*, uno de los muchos endemismos presentes en Canarias.

### Conclusions.

- ❖ In this work it has been demonstrated that *Plocama pendula* presents an ecosystem rich in endophytic species. According to the Simpson index obtained, the results show an unequal distribution, in which we have few dominant species and many species represented in low frequency.
- ❖ The dominant strains have been P1, P4 and P19, with a high distribution in all organs of the plant that have been sampled (stem, branches and leaves).
- ❖ Of all the organs studied, the stem (closest to the root) seems to be the area with the greatest diversity of endophyte fungi, which determines the possible entry of the fungi into the plant.
- ❖ The endophytic fungi with the highest antagonistic activity have been P2, P4, P7, P8 and P20, which have been active against the 3 targets. On the other hand, the pathogen *Botrytis cinerea* was the most sensitive to them.
- ❖ Finally, it should be taken into account that this study is based on a single sampling, so it is based on conclusions drawn from the data obtained and from the bibliography consulted, therefore, they should be expanded and confirm them in future work. Nevertheless, it has allowed to expand the knowledge on the biodiversity of endophytic fungi present in the species *Plocama pendula*, one of the many endemisms present in the Canary Islands.

## 6. Bibliografía.

- ❖ Agrios G. N. (2005). Fitopatología. Editorial Limusa, S. A.
- ❖ Aguilera F., Brito A., Castilla C., Fernández- Palacios JM., Rodríguez A. (1993). Economía y ecología en Canarias: una aproximación. Universidad de La Laguna. Estudios regionales nº 34, PP 15-52.
- ❖ Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P., (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Appl. Microbiol. Biotechnol.
- ❖ Anne E. Magurran. (2004). Measuring biological diversity. Blackwell publishing.
- ❖ Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D. and Kursar, T.A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology Letters 3: 267-274.
- ❖ Bacon, C.W., and White, J.F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. (2000). Microbial Endophytes (New York: Marcel Dekker Inc.).
- ❖ Cabrera Pérez, M. A. (1999). Flora autóctona de las Islas Canarias. Editorial Everest.
- ❖ Carvalho CR, Gonçalves VN, Pereira CB, Johann S, Galliza IV, Alves TMA, Rabello A, SobralMEG, Zani CL, Rosa CA, Rosa LH (2012). The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. Symbiosis 57(2):95–107.
- ❖ Del Arco Aguilar M.J., González R., Garzón V., Pizarro B. (2010). Actual and potential natural vegetation on the Canary Islands and its conservation status. Biodivers Conserv. 19:3089–3140.
- ❖ Deng Z., Cao L., (2016). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. Chemosphere 168 ; 1100 -1106.
- ❖ Eriksson, O., Hansen, A., Sunding, P., 1979. Flora of Macaronesia. Checklist of Vascular Plants. Part I: Botanical Garden and Museum. University of Oslo, Oslo.
- ❖ Fraga B. M., Quintana N., Díaz C. E. (2009). Anthraquinones from Natural and Transformed Roots of *Plocama pendula*. Chemistry & biodiversity- Vol. 6.
- ❖ Fraga B. M., Quintana N., Díaz C. E. (2011). Dihydroanthracenones and hydronaphthalenones from the roots of *Plocama pendula*. Phytochemistry Letters 5: 211–213.
- ❖ Freeman, E.M. (1904). The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel. Phil. Trans. R. Soc. B 196, 1–27.
- ❖ Gamboa-Gaitán MA, Laureano S, Bayman P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? Mycopathologia 156:41–45.
- ❖ Gamboa-Gaitán M. A. (2006). Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- ❖ Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: selection of microbial population by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annu Rev Phytopathol 42:243–270.
- ❖ George N. Agrios. (2005). Plant pathology. Elseiver Academic Press.
- ❖ Ghimire SR, Charlton ND, Bell JD, Krishnamurthy YL, Craven KD (2011) Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum*L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. Fungal Divers 47:19–27
- ❖ Giménez C. (2006). Productos bioactivos de plantas canarias y sus hongos endófitos: detección de actividad y utilización en el control de plagas y enfermedades agrícolas. Tesis doctoral. Dpto. Biología vegetal (Fitopatología). Universidad de La Laguna.
- ❖ Jin H., Yan Z., Liu Q., Yang X., Chen J., Qin B. (2013). Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China. Antonie van Leeuwenhoek 104:949-963.
- ❖ Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. (2012a) Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chem & Biol 19(7): 792–798.
- ❖ Kusari, S., and Spiteller, M. (2012b). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In Metabolomics, pp. 241–266.
- ❖ Li HY, Wei DQ, Shen M, Zhou ZP (2012) Endophytes and their role in phytoremediation. Fungal Divers 54(1):11–18.

- ❖ Marrero Gómez M.C., Rodríguez Delgado O., Wilpret de la Torre, W., (1999). Contribución al estudio descriptivo y etnobotánico del balo (*Plocama pendula*). Anuario Inst. Estudios Canarios.
- ❖ Parijat Kusari & Souvik Kusari & Michael Spiteller & Oliver Kayser (2013). Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. 60:137–151.
- ❖ Porras-Alfaro A., Paul Bayman P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annu. Rev. Phytopathol. 2011. 49:291–315.
- ❖ Quintana, N. (2006). Metabolitos secundarios en raíces de *Plocama pendula*. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna, IPNA-CSIC.
- ❖ Schulz B., Rommert AK., Dammann U., Aust HJ., Strack D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? Mycological Research 10: 1275–1283.
- ❖ Suryanarayanan T. S. and Vijaykrishna D. (2001). Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. Fungal Diversity 8: 155-161.
- ❖ Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Gopalan V (2012) Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. Fungal Divers 54(1):19–30.
- ❖ Wang Y, Dai CC (2011) Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. AnnMicrobiol 61(2):207–215
- ❖ You-Kun Zheng, Xin-Guo Qiao, Cui-Ping Miao, Kai Liu, You-Wei Chen, Li-Hua Xu & Li-Xing Zhao. (2015). Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan.
- ❖ Zheng YK., Qiao XG., Miao CP., Liu K., Chen YW., Xu LH., Zhao LX. (2016). Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. Ann Microbiol. 66:529–54.