

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **Grado en Biotecnología**



### **POTENCIAL BIOPLAGUICIDA DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE *Bethencourtia palmensis***

**Autor: Marta Rosado Muñoz**

Villaviciosa de Odón, *Julio 2022*

## **ANEXO IX**

**Título del Trabajo:** POTENCIAL BIOPLAGUICIDA DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE *Bethencourtia palmensis*.

Este trabajo ha sido realizado en El Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), perteneciente al CSIC. El ICA es un centro de excelencia en investigación agroambiental fundado en 2004 con el objetivo de abordar los retos de la agricultura española moderna y especializada. El trabajo se ha realizado en la línea de investigación titulada “Bioplaguicidas: Biotecnología y Química de Productos Naturales” a cargo de la investigadora Azucena González Coloma, perteneciente al departamento de protección vegetal.



**Tutores:** Azucena González Coloma, Jorge Rojas López, María Fe Andrés Yeves y Silvia Roscales García.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>9</b>  |
| <b>3.1 Material vegetal</b>  | <b>9</b>  |
| <b>3.2 Esterilización del material vegetal</b>                                     | <b>9</b>  |
| <b>3.3 Aislamiento de los hongos endófitos</b>                                     | <b>9</b>  |
| <b>3.4 Fermentación de los hongos endófitos</b>                                    | <b>10</b> |
| <b>3.4 Recuperación de extractos</b>   | <b>10</b> |
| <b>3.5 Bioensayos</b>  | <b>11</b> |
| 3.5.1 Ensayos de actividad antialimentaria de <i>Myzus persicae</i>                | 11        |
| 3.5.2 Ensayos de actividad nematocida frente a <i>Meloidogyne javanica</i>         | 12        |
| 3.5.3 Ensayos de germinación de esporas de <i>Botrytis cinerea</i>                 | 14        |
| <b>3.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa</b>                | <b>15</b> |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | <b>16</b> |
| <b>4.1 Hongos aislados de <i>B. palmensis</i> y sus extractos</b>                  | <b>16</b> |
| <b>4.2 Resultados de actividad antialimentaria de <i>Myzus persicae</i></b>        | <b>18</b> |
| <b>4.3 Resultados de actividad nematocida frente a <i>Meloidogyne javanica</i></b> | <b>19</b> |
| <b>4.4 Resultados de inhibición de germinación de <i>Botrytis cinerea</i></b>      | <b>21</b> |
| <b>4.5 Perfiles químicos de extractos bioactivos por GC/MS</b>                     | <b>24</b> |
| <b>5. CONCLUSIÓN</b>   | <b>28</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>29</b> |

## RESUMEN

La protección de cultivos en los últimos años se ha basado en el uso de plaguicidas químicos sintéticos, no obstante, su uso se está restringiendo debido a una legislación cada vez más estricta de la Unión Europea centrada en una producción sostenible y segura de alimentos. El descubrimiento de nuevos bioplaguicidas constituyen la mejor alternativa para controlar las plagas y enfermedades de los cultivos. Los hongos endófitos de plantas ubicadas en hábitats restringidos han demostrado ser un reservorio prometedor de metabolitos bioactivos con potencial plaguicida. En este estudio se ha evaluado el potencial de siete hongos endófitos aislados de *Bethencourtia palmensis* para producir extractos con actividad nematocida frente a *Meloidogyne javanica*, fungicida frente a *Botrytis cinerea* y antialimentaria contra *Myzus persicae*, que constituyen tres plagas importantes en la agricultura. Los resultados indican que los hongos BPG5, BPT4, BPF4.1 y BPF9 son los que mayor potencial presentan para la producción de bioplaguicidas puesto que sus extractos reportaron bioactividad contra una o más de las plagas ensayadas. La obtención de los perfiles químicos de los extractos activos por GC/MS reveló una multitud de compuestos que podrían ser los responsables de sus bioactividades.

## ABSTRACT

In recent years crop protection has been based on the use of synthetic chemical pesticides. However, their use is being restricted due to increasingly strict European Union legislation focused on sustainable and safe food production. The discovery of new biopesticides constitutes the best alternative to control crop pests and diseases. Endophytic fungi of plants located in restricted habitats have shown to be a promising reservoir of bioactive metabolites with pesticidal potential. In this study, the potential of seven endophytic fungi isolated from *Bethencourtia palmensis* has been evaluated to produce extracts with nematocidal activity against *Meloidogyne javanica*, fungicidal activity against *Botrytis cinerea* and antifeedant activity against *Myzus persicae*, which are three important pests in agriculture. The results indicate that the fungi BPG5, BPT4, BPF4.1 and BPF9 are the ones with the greatest potential to produce biopesticides, since their extracts reported bioactivity against one or more of the pests tested. Obtaining the chemical profiles of the active extracts by GC/MS revealed a multitude of compounds that could be responsible for their bioactivities.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos endófitos son aquellos que viven en el interior de las plantas manteniéndose asintomáticos, es decir, sin provocar ninguna manifestación visible de enfermedad [1, 2]. El término endófito engloba tanto hongos como bacterias, no obstante, los más frecuentes aislados de plantas para su estudio son los hongos [3, 6]. Estos microorganismos se han extraído de distintos huéspedes que van desde plantas herbáceas hasta leñosas, situadas en un amplio rango de ecosistemas. Dentro del huésped, los endófitos se pueden localizar en una gran variedad de tejidos y órganos como tallos, raíces, hojas, corteza, xilema, semillas y frutos [4].

Numerosos estudios evidencian que las interacciones bioquímicas entre las plantas y sus endófitos generan una mayor resistencia a herbívoros, patógenos y estrés en el huésped [5, 26, 27]. Esto se debe en gran medida a la adaptación de los endófitos al microambiente de la planta, capaces de incluir y expresar ADN de ésta en su genoma [7]. De esta forma, los endófitos son capaces de sintetizar metabolitos secundarios biológicamente activos similares a los de su huésped [8, 9, 10]. Estas moléculas desempeñan un papel importante en la protección de las plantas, la comunicación entre ellas y su adaptación a los cambios ambientales [3].

La relación de la planta con sus endófitos suele ser predominantemente mutualista, en la que los metabolitos producidos por el hongo no afectan a la integridad de la planta y viceversa. Además, a partir de estos compuestos producidos por organismos endófitos es posible desarrollar nuevos fármacos y biopesticidas que sean seguros a su contacto con seres humanos y animales [12].

Muchos investigadores han demostrado el potencial de los hongos endófitos en la producción de compuestos bioactivos con aplicaciones medicinales o agrícolas muy prometedoras [3, 11]. Dentro de los compuestos naturales producidos por hongos endófitos, caben destacar los flavonoides, esteroides, alcaloides, terpenoides, quinonas, isocumarinas, lignanos, fenoles, compuestos alifáticos y lactonas [4]. Algunos de estos compuestos tienen múltiples propiedades medicinales como anticancerígenos, antibióticos, antiinflamatorios y antioxidantes [4, 13-15]. Sin embargo, cada vez están

teniendo más relevancia en el campo de la agricultura por sus aplicaciones en la protección de cultivos [11, 17-20].

La protección de cultivos en los últimos años se ha basado en el uso de plaguicidas químicos sintéticos. El uso masivo y generalizado de éstos puede acarrear serios problemas ambientales y riesgos en la seguridad alimentaria [34]. No obstante, su uso se está reduciendo debido a una legislación cada vez más estricta de la Unión Europea centrada en una producción sostenible y segura de alimentos.

La eliminación gradual de estos pesticidas químicos está dejando a los agricultores sin opciones para controlar las plagas y enfermedades de los cultivos que causan grandes pérdidas en la producción [11]. Entre la gran variedad de microbios endófitos, los hongos han demostrado ser un reservorio prometedor de metabolitos bioactivos con potencial plaguicida y respetuosos con el medio ambiente [21].

Actualmente no existe demasiada información sobre la biogeografía de los hongos endófitos y el establecimiento de sus comunidades en ecosistemas concretos. No obstante, un estudio de los endófitos en angiospermas tropicales y helechos, mostró que los taxones procedentes de bosques nubosos presentaban mayor grado de bioactividad en comparación con aquellos provenientes de bosques de tierras bajas [22].

En este contexto, este trabajo de investigación se ha encaminado hacia la selección de plantas que se encuentren en hábitats restringidos y que puedan contener endófitos con características únicas como la producción de metabolitos secundarios poco habituales [23].

La región Macaronésica se caracteriza por tener una gran biodiversidad botánica. Consta de tres archipiélagos de origen volcánico (Madeira, las Azores y las Islas Canarias) que presentan paisajes contrastantes y climas templados. Estas características crean un ambiente ideal para una biodiversidad excepcionalmente rica. Gracias a su hábitat forestal único, las Islas Canarias son las más biodiversas de la región y una de las más ricas del mundo. Aproximadamente el 25% de las especies de plantas son endémicas [24] y, por lo tanto, tienen una comunidad microbiana endógena potencialmente rica [25]. El potencial biotecnológico inexplorado de los hongos endófitos procedentes de estas regiones puede dar lugar a nuevos productos con valiosas aplicaciones agrícolas [11].

Se ha reportado que algunas especies endémicas de las islas Canarias poseen endófitos con actividad insecticida, y los extractos obtenidos de ellos tienen efectos fitosanitarios, como actividad antifúngica y antialimentaria de insectos [11, 16]. Dentro de las especies endémicas de Canarias destaca el género *Bethencourtia* [26, 27] compuesto por tres especies distintas: *Bethencourtia hermosae*, *Bethencourtia rupícola* y *Bethencourtia palmensis* [28].

Estudios realizados sobre *Bethencourtia palmensis* mostraron la presencia de sesquiterpenos de tipo silfineno con fuertes propiedades antialimentarias de insectos al actuar sobre los receptores GABA (ácido gamma-aminobutírico) de estos [27].

En consecuencia, en este estudio se ha seleccionado *B. palmensis* para realizar el aislamiento de sus hongos endófitos y estudiar el potencial de sus extractos orgánicos como agentes nematocidas, antifúngicos y antialimentarios de insectos.

Este trabajo se enfoca en siete hongos distintos aislados de *B. palmensis*, donde se informa sobre la actividad bioplaguicida de sus extractos orgánicos frente a hongos patógenos (*Botrytis cinerea*), pulgones (*Myzus persicae*) y nematodos (*Meloidogyne javanica*) (figura 1) y sus perfiles químicos.

*Myzus persicae*, es una especie invasora de homóptero ampliamente distribuida por el mundo. El hospedante principal son plantas del género *Prunus*, destacando *Prunus persica* (el melocotonero), aunque se puede hospedar en más de cuarenta familias de plantas diferentes, la gran mayoría de alto interés económico. Estos pulgones son capaces de transmitir más de cien tipos de virus, además de causar daños directos en los cultivos por lo que se considera una seria plaga en cultivos de frutales [29].

*Meloidogyne javanica* es una especie de nematodos formadores de nódulos en las raíces de las plantas. Constituye uno de los principales fitopatógenos en agricultura ya que presenta una distribución mundial y es capaz de infectar a más de 3000 especies de importancia agrícola, causándoles daños severos. Se trata de endoparásitos obligados que llevan a cabo la infección cuando se convierten en juveniles de segundo estadio (J2). Los juveniles J2 penetran por las raíces y permanecen en su interior durante todo su ciclo vital. La formación de agallas en las raíces impide una absorción normal de agua y nutrientes, afectando al crecimiento de la planta, provocando marchitamiento y aumentando su susceptibilidad a infecciones por otros patógenos [30,31].

*Botrytis cinerea*, es un hongo patógeno de más de 200 especies vegetales, aunque los daños económicos más importantes destacan en plantaciones de fresas y uvas. Las esporas del hongo penetran en la planta a través de cualquier herida y, si se dan las condiciones adecuadas de humedad elevada y temperatura suave, las esporas germinan en el interior de la planta causando necrosis de los tejidos. Constituye una de las enfermedades de plantas más frecuentes ya que las esporas tienen un alto grado de supervivencia, incluso en condiciones desfavorables [32]. Además, una vez que se da la infección, es muy difícil revertirla ya que se propaga con gran facilidad y rapidez pudiendo destrozar las cosechas en poco tiempo. También puede propagarse en etapas posteriores al cultivo como puede ser el almacenamiento o el transporte, generando pérdidas cuantiosas para los agricultores [33].



**Figura 1:** a) Foto de *Myzus persicae*, b) Foto de *Meloidogyne javanica*, c) Foto de un cultivo de *Botrytis cinerea*.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general es:

- Seleccionar las especies fúngicas extraídas de la microbiota endofítica de *Bethencourtia palmensis* con mayor potencial para la producción de bioplaguicidas.

Los objetivos específicos son:

- Fermentar y obtener los extractos (metabolitos secundarios) de 7 hongos endófitos extraídos de *B. palmensis*.
- Medir de los niveles de actividad de los extractos frente a hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*), áfidos (*Myzus persicae*) y nematodos (*Meloidogyne javanica*).
- Obtener los perfiles químicos de los extractos bioactivos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

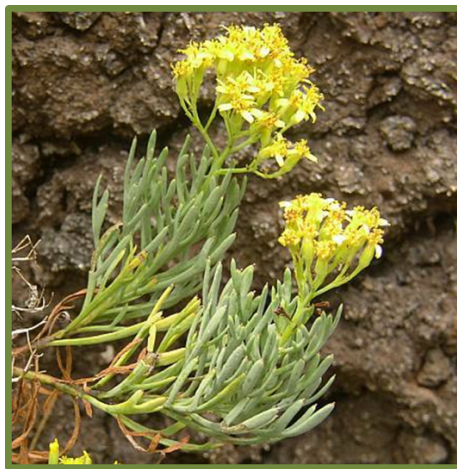


### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

El material vegetal empleado fue *Bethencourtia palmensis* (figura 2), una planta herbácea y arbustiva de la familia asteráceas.

Se recolectaron ejemplares de *B. palmensis* de dos localizaciones distintas: Los Andenes y el Barranco de los Guanches, en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente (La Palma, Islas Canarias). El material vegetal se guardó en bolsas de plástico estériles y se transportó en un contenedor en condiciones de refrigeración. El aislamiento de los hongos endófitos se realizó transcurridas 48 horas desde la recolección.



**Figura 2:** Foto de *Bethencourtia palmensis*.

#### 3.2 Esterilización del material vegetal

Se seleccionaron las hojas, el tallo y las flores maduras de cada planta. Las partes seleccionadas se lavaron con agua para eliminar restos de tierra y suciedad superficial. Con el fin de eliminar los organismos epifitos existentes en las plantas, se esterilizaron las hojas, el tallo y las flores sumergiéndolas durante 1 min en una solución de etanol al 75%, seguido de un lavado con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 2 min. Finalmente, el material vegetal se lavó con agua destilada y se secó con papel bajo condiciones estrictamente asépticas.

#### 3.3 Aislamiento de los hongos endófitos

El material vegetal estéril se cortó con un bisturí en pequeños explantos y se transfirió a placas Petri con un medio comercial de agar patata dextrosa (PDA) con 50 mg/L de

cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano. En cada placa se sembraron tres fragmentos del mismo tipo, y se hicieron dos repeticiones para cada tipo de explanto. Las placas se incubaron en una cámara de cultivo a 28°C, realizándose periódicamente observaciones de las mismas. A medida que las colonias de hongos endófitos crecieron alrededor de los explantos, se sembraron de forma aislada en nuevas placas Petri con medio PDA y se dejaron crecer a 28°C para obtener cultivos puros.

### **3.4 Fermentación de los hongos endófitos**

De los cultivos puros de cada hongo, se raspó suavemente con un asa de siembra para arrastrar micelio y se disgregó en el interior de matraces Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 50 ml de un medio comercial de caldo patata dextrosa (PDB). Esta suspensión se cultivó durante 21 días en agitación orbital continua a 120 rpm y 25°C.

Las fermentaciones de cada hongo se realizaron por cuadruplicado.

La manipulación de los cultivos se efectuó bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar TELSTAR AV-100.

Previo a la inoculación, los medios de fermentación se autoclavaron en las condiciones estándar de 121°C y 1 atmósfera de presión, durante 30 minutos.

### **3.4 Recuperación de extractos**

Una vez finalizado el tiempo de las fermentaciones, se recogió una muestra de medio de cada matraz y se observó al microscopio para descartar la presencia de contaminaciones bacterianas. Posteriormente, el micelio se separó del medio de cultivo por filtración a vacío en un embudo Büchner.

Los metabolitos secundarios presentes en el medio se separaron del mismo mediante una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (EtOAc) como disolvente. Para la realización de la extracción se añadió un volumen final de 150 ml de EtOAc sobre el medio fermentado un embudo de decantación, esperando hasta la completa separación de la fase acuosa y la fase orgánica tras agitaciones vigorosas con el fin de mezclar temporalmente ambos líquidos para facilitar la extracción de los compuestos. Se realizaron 3 extracciones de cada medio de cultivo para recuperar el máximo posible de extracto.

La fase orgánica recolectada se secó con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y los extractos que contiene, se concentraron por rotación al vacío a presión reducida (<240 atm) y

temperatura de 40°C. Los extractos crudos secos se pesaron y fueron almacenados en condiciones de refrigeración hasta el momento de su utilización.

### 3.5 Bioensayos

Las especies de nematodos, pulgones y hongos patógenos se han seleccionado por la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, su capacidad de transmisión de virus (en el caso de pulgones) así como su disponibilidad y facilidad de cría y mantenimiento en el laboratorio.

#### 3.5.1 Ensayos de actividad antialimentaria de *Myzus persicae*

Las poblaciones de *M. persicae* utilizadas en los ensayos se criaron en cámaras climatizadas sobre plantas de pimiento morrón (*Capsicum annuum*), transfiriéndolos a plantas frescas cada 7-10 días. Las cámaras climatizadas se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 1$  °C, humedad relativa del 60-70 % y fotoperíodo de 16:8 horas (luz:oscuridad).

Para realizar los ensayos con pulgones se utilizaron cajas de plástico de 3x3x1.5 cm, tapadas y con ventilación. En cada caja se colocó una capa fina de agar (1%) que permite la adhesión de las hojas y ayuda a mantener la humedad de estas.

Se cortaron discos de 2 cm<sup>2</sup> de hoja de pimiento morrón (*Capsicum annuum*) y se dividieron por la mitad. Sobre el agar de cada caja se colocaron dos medios discos. Una mitad del disco se trató con 10 µl de etanol (control) y la otra mitad con 10 µl de extracto a una concentración de 10 mg/ml disuelto en etanol (tratamiento).

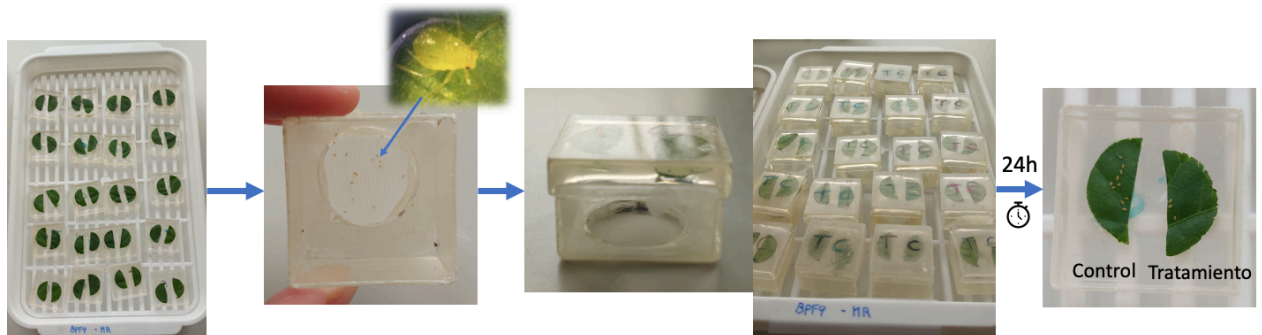
Para cada muestra se han utilizaron 20 cajas, con 10-15 pulgones en cada una.

Las cajas se incubaron durante 24 horas en posición invertida, es decir, con los pulgones en la parte inferior y los discos de hojas en la parte superior de la caja (Figura 3). La incubación se llevó a cabo en una cámara a  $22 \pm 1$ °C y bajo luz indirecta con un fotoperíodo de 16:8 horas (luz:oscuridad). Transcurridas 24 horas se contaron el número de pulgones asentados tanto en el tratamiento como en el control y se calculó el índice de inhibición del asentamiento (%SI) para cada tratamiento con la siguiente fórmula:

$$\%SI = 1 - \left( \frac{\%T}{\%C} \right) \times 100$$

Donde %C y %T representan el porcentaje de pulgones asentados en el control y en el tratamiento respectivamente [35].

En caso de extractos que obtuvieron un %SI mayor de 70%, se realizaron ensayos de dosis-respuesta, disminuyendo a la mitad la concentración del extracto usado en el tratamiento (se ensayaron dosis de 5 mg/ml y de 2,5 mg/ml). También se calcularon las concentraciones efectivas al 50% (CE<sub>50</sub>) de los extractos activos mediante una regresión lineal de los %SI frente a los logaritmos de las dosis, empleando para ello el programa estadístico Statgraphics Centurion.



**Figura 3:** Bioensayo de actividad antialimentaria de *M. persicae*.

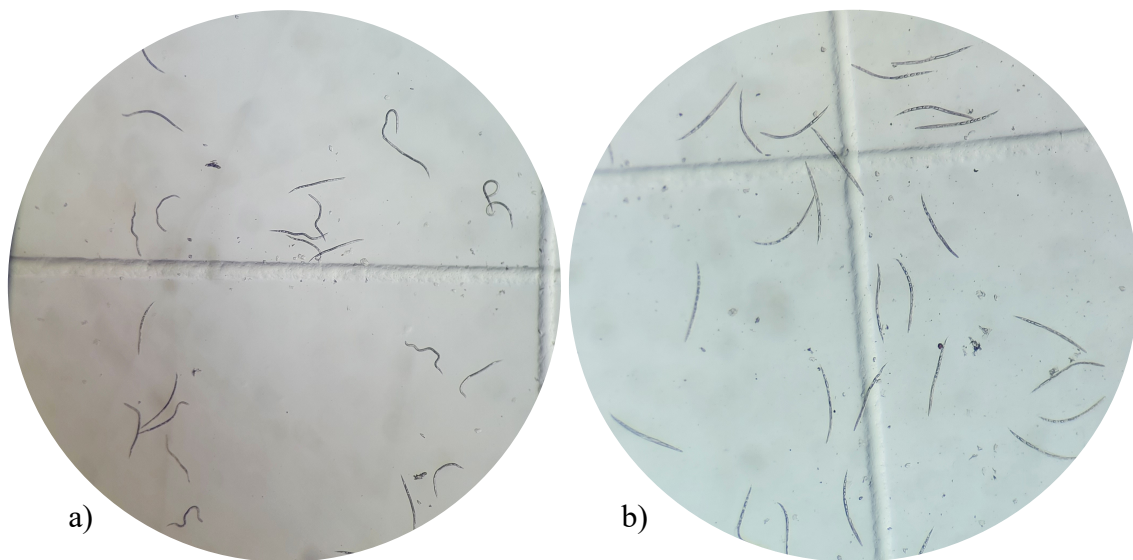
### 3.5.2 Ensayos de actividad nematocida frente a *Meloidogyne javanica*

Las poblaciones de *Meloidogyne javanica* utilizadas en los ensayos se mantuvieron en plantas de tomate de *Lycopersicon esculentum* (var. Marmande) a una temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa del 70%. Cada dos meses se levantaron las plantas para extraer manualmente las masas de huevos de las raíces bajo microscopio estereoscópico. Las masas recolectadas se colocaron con la ayuda de pinzas en filtros semisumergidos en agua destilada y se incubaron en una cámara a  $24^{\circ}\text{C}$  para que los huevos comenzasen a eclosionar. Transcurrido un mes se obtuvieron los juveniles J2 infectivos que constituyen el inóculo para el ensayo.

Los ensayos con nematodos se realizaron en placas estériles de 96 pocillos con fondo en U [37]. Se hicieron cuatro repeticiones para cada tratamiento y para el control.

El control contenía 95  $\mu\text{l}$  de una solución de juveniles J2 en agua destilada (100 nematodos/95  $\mu\text{l}$ ) y 5  $\mu\text{l}$  de disolvente DMSO 100%+Tween 0,6%. El tratamiento contenía 95  $\mu\text{l}$  de la solución de juveniles J2 en agua destilada (100 nematodos/95  $\mu\text{l}$ ) y 5  $\mu\text{l}$  del extracto a ensayar a una concentración de 20 mg/ml en DMSO 100% + Tween 0,6%. De este modo se obtuvo una concentración final de 1 mg/ml de extracto en cada pocillo. Los pocillos de alrededor del tratamiento y del control se rellenaron con agua

para mantener la humedad y disminuir el efecto borde. Finalmente, la placa se selló con Parafilm y se envolvió con papel de aluminio para impedir el paso de la luz. Las placas se incubaron durante 3 días a 24°C. Tras el periodo de incubación se realizó el recuento de nematodos vivos y muertos de cada réplica en un microscopio estereoscópico, considerando como muertos los nematodos sin movimiento, con formas rígidas y con burbujas en su interior (Figura 4).



**Figura 4:** a) Muestra de un control con nematodos vivos; b) Muestra de un tratamiento activo con nematodos muertos.

Los resultados de actividad nematocida de cada muestra se calcularon como porcentaje corregido de juveniles J2 muertos (M%) de acuerdo con la fórmula de Scheider-Orelli mostrada a continuación.

$$M(\%) = \left( \frac{\%T - \%C}{100 - \%C} \right) \times 100$$

Donde %T indica el porcentaje de nematodos muertos en el tratamiento y %C indica el porcentaje de nematodos muertos en el control.

Con los extractos que obtuvieron un porcentaje de actividad mayor del 90%, se realizaron ensayos de dosis-respuesta, disminuyendo a la mitad la concentración del extracto usado en el tratamiento (se ensayaron dosis de 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml y 1,25 mg/ml que suponen una concentración final en el pocillo de 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,125 mg/ml respectivamente). Las dosis letales eficaces al 50 y 90% (LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>) de los extractos activos se han calculado mediante análisis Probit [36], empleando para ello el programa estadístico Statgraphics Centurion.

### 3.5.3 Ensayos de germinación de esporas de *Botrytis cinerea*

Los cultivos de *Botrytis cinerea* utilizados en los ensayos se mantuvieron en placas Petri con medio PDA a 25°C, realizándose pases cada 15-20 días a medio fresco.

Para realizar los ensayos se prepararon suspensiones de esporas a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml en una solución salina de NaCl a 0,9%. Para ello, se añadieron 10 ml de la solución salina sobre una placa de PDA de 3 días de cultivo de *Botrytis cinerea* y con una torunda estéril se resuspendieron las esporas. La solución se filtró para eliminar los restos de micelio. Finalmente, se contaron las esporas en cámara de Neubauer para obtener la concentración deseada de  $1 \times 10^7$  esporas/ml.

Los ensayos se realizaron en placas estériles de 96 pocillos con fondo plano. Los extractos se prepararon a una concentración de 80 mg/ml en DMSO (dimetilsulfóxido) y se hicieron diluciones seriadas con agua estéril sobre los pocillos de la placa para ensayarlos a concentraciones finales de 800, 400, 200, 100 y 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se realizaron 4 repeticiones para cada concentración. Como control negativo se utilizó agua estéril con DMSO al 1%.

Finalmente se añadió a cada pocillo (incluido el control) 100  $\mu\text{l}$  de medio RPMI<sub>MOPS</sub> y 20  $\mu\text{l}$  de la solución de esporas ( $1 \times 10^7$  esporas/ml).

El medio RPMI<sub>MOPS</sub> utilizado se preparó mezclando 1,042 g de RPMI (Sigma-aldrich), 3,45 g de MOPS (Acros organics), 200  $\mu\text{l}$  de estreptomycin y penicilina al 1% (Gibco) y 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada.

Las placas se incubaron a 25°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de un revelador (solución de 3 ml de RPMI con 15 mg de MTT (Acros organics) y 0,52 mg de menadiona (Acros organics)) en cada pocillo y se incubaron durante 3 horas a 25°C. Seguidamente, se eliminó todo el medio posible de los pocillos mediante aspiración dejando las esporas precipitadas en el fondo y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de isopropanol ácido (95% isopropanol, 5% HCl 1M) por pocillo. Finalmente, se incubaron otros 30 minutos a 25°C y se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector ELISA acoplado a un ordenador con el Software Gen5 2.01. Si los extractos no han logrado inhibir la germinación de las esporas de *B. cinerea*, estas habrán metabolizado los reactivos y provocado un viraje de color en el medio, por este motivo se leen las absorbancias.

Los resultados de la germinación se calculan como porcentaje de germinación respecto al control (%G) como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\%G = \left( \frac{\%Gt}{\%Gc} \right) \times 100$$

Donde %Gt indica el porcentaje de germinación en el tratamiento y %Gc indica el porcentaje de germinación en el control.

Las dosis efectivas de los extractos activos para lograr un 50% de inhibición de la germinación (CE<sub>50</sub>) se han calculado mediante una regresión lineal de los porcentajes de germinación con respecto al control frente a los logaritmos de las dosis, empleando el programa estadístico Statgraphics Centurion.

### **3.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa**

La determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos presentes en los extractos activos se hizo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Se empleó un equipo Shimadzu GC-2010 acoplado a un detector de masas Shimadzu GCMS-QP2010-Ultra con una fuente ionización por impacto electrónico a 70 eV y utilizando como analizador un Cuadrupolo Simple. Se utilizó Helio como gas portador. Las muestras fueron inyectadas por un inyector automático (AOC-20i). La cromatografía se llevó a cabo con una columna capilar Teknokroma TRB-5 (95%) Dimetil- (5%) difenilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm ID y 0.25 µm de espesor de fase. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron: inyección en modo “Split” inyectando 1 µl de muestra con una relación de división (20:1) mediante un inyector automático Shimadzu AOC-20i, temperatura del inyector 300°C, temperatura de la línea de transferencia conectada al espectrómetro de masas 250°C y temperatura de la fuente de ionización 220°C. La temperatura de la columna inicial fue de 110°C, calentando hasta 290°C a 7°C /min y dejando a 290°C durante 15 min. Los espectros de masas y el tiempo de retención se han utilizado para identificar los compuestos por comparación con los encontrados en la base de datos Wiley (Wiley 275 Mass Spectra Database 2001) y NIST 17, mientras que para la cuantificación se han utilizado los porcentajes de área relativos de todos los picos obtenidos en los cromatogramas.

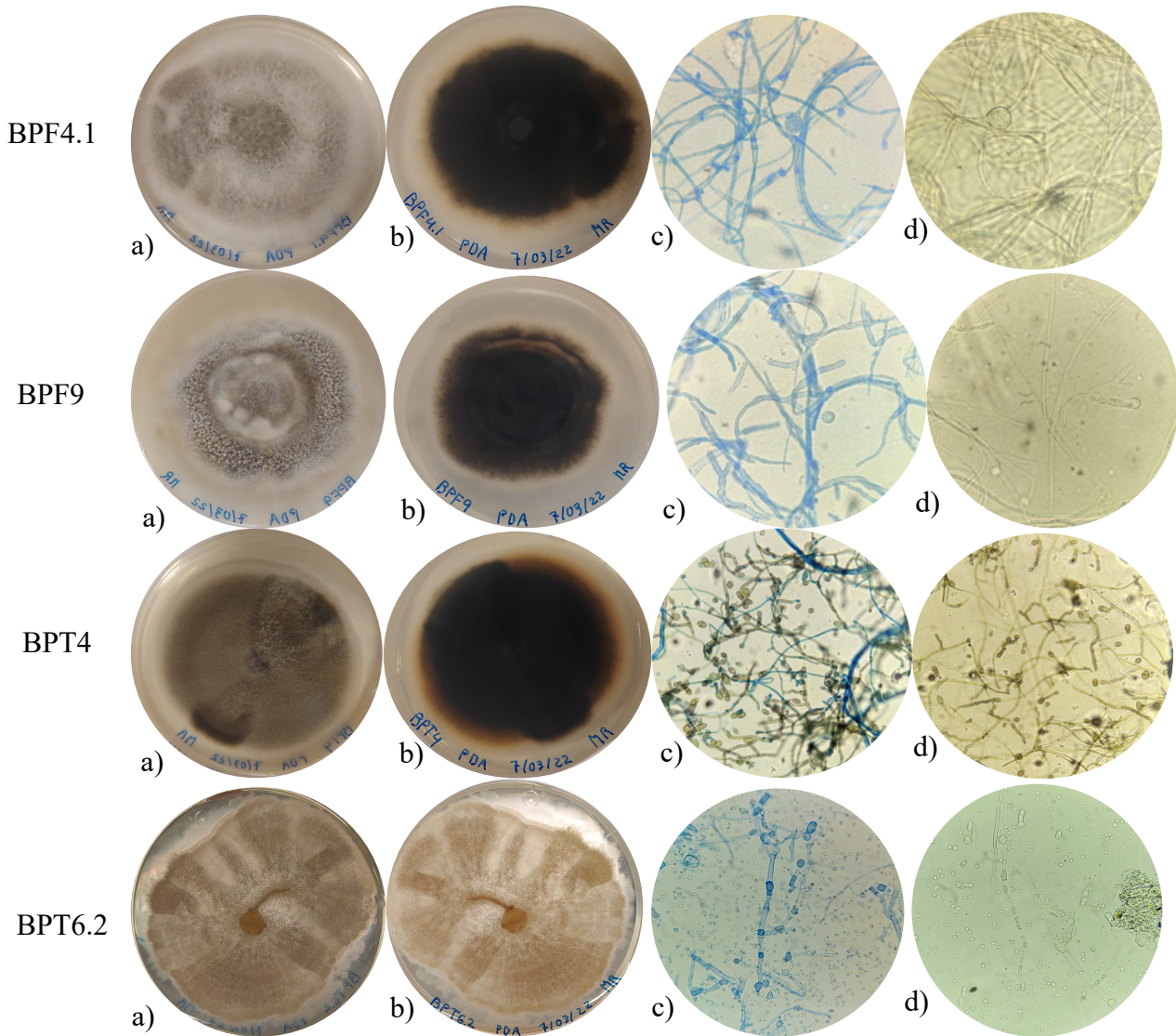
Todas las muestras fueron disueltas en diclorometano al 100%, para llevar a cabo su inyección.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

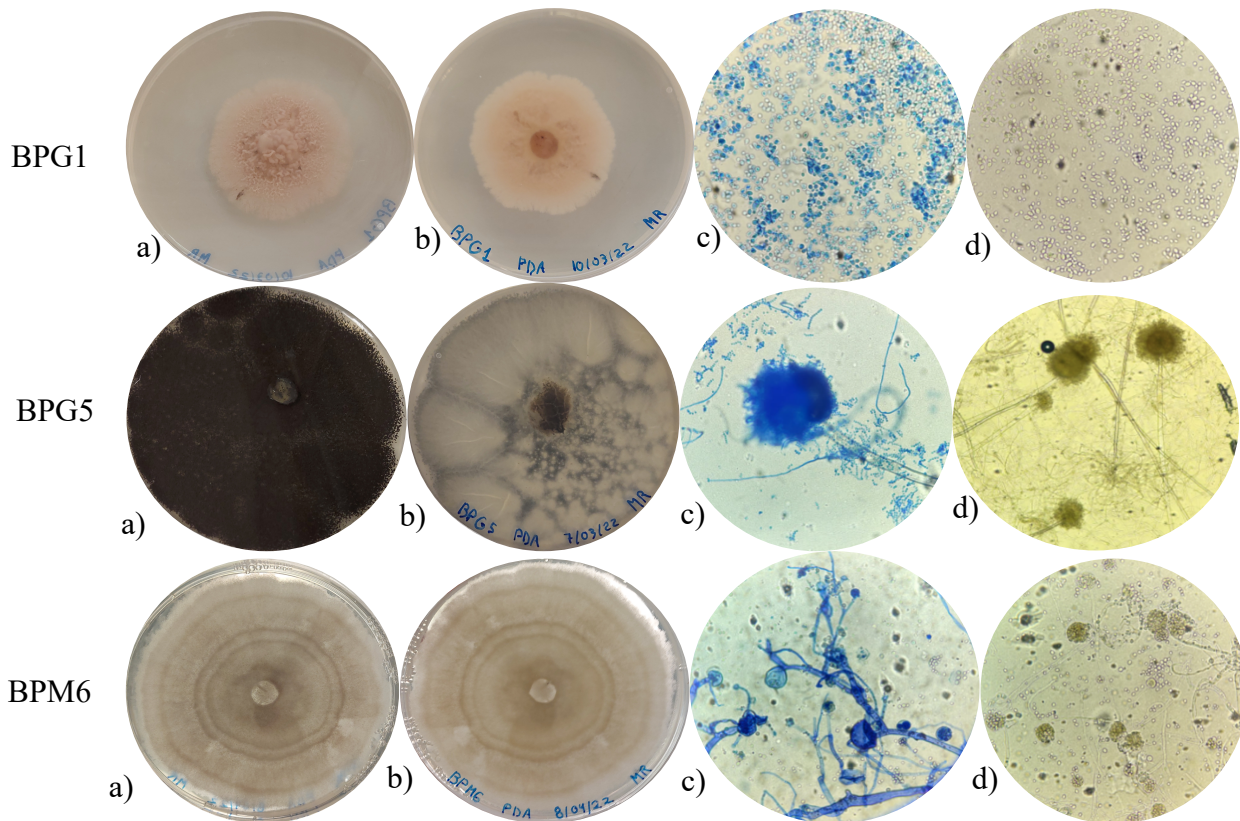
### 4.1 Hongos aislados de *B. palmensis* y sus extractos

Se aislaron un total de 50 hongos de la microbiota endofítica de *B. palmensis* y se clasificaron por su morfología y el aspecto de las colonias, quedando pendiente su identificación genética por secuenciación de las regiones ITS. Para este trabajo se seleccionaron 7 hongos morfológicamente distintos los cuales fueron nombrados en el momento de su aislamiento como BPF4.1, BPF9, BPT4, BPT6.2, BPG1, BPG5 y BPM6 (Figura 5).

Todos ellos fueron aislados del tallo de *B. palmensis* a excepción de BPF4.1 y BPF9 que se aislaron de las flores.







**Figura 5:** a) Foto de las colonias de los hongos por la parte superior de las placas crecidos en medio PDA. b) Foto de las colonias por la parte inferior de las placas. c) Tinciones del micelio con azul de lactofenol observadas con microscopio óptico. d) Tinciones del micelio con ácido láctico observadas con microscopio óptico.

Como se muestra en la [figura 5](#), los hongos BPF4.1 y BPF9 presentan colonias de color blanco y gris con hifas aseptadas y ramificadas. BPT4 presenta una colonia marrón oscuro con conidióforos tabicados de forma ovoide que podría asemejarse al género *Alternaria* debido a la presencia de esporas tabicadas típicas de este género. BPT6.2 es un hongo filamentoso que forma colonias color marrón claro con hifas septadas, ramificadas y conidióforos simples. En el caso de BPG1, el hongo presenta colonias rosa claro y un talo levaduriforme que en ocasiones pueden encontrarse formando pseudohifas (no visibles en la imagen). BPG5 se asemeja a un *Aspergillus* de la sección *nigris*, con esporas de color negro visibles en la parte superior de la placa y un micelio de color blanco, visible en la parte inferior. Además, presenta hifas hialinas septadas y conidios globosos típicos del género. Finalmente, la colonia de BPM6 presenta unos halos simétricos de color marrón y su hifa es septada y ramificada con presencia de fíbulas.

Los miligramos de extracto obtenidos tras la fermentación durante 21 días de cada hongo en medio PDB y la extracción líquido-líquido de los compuestos en sus respectivos medios de cultivo, cada uno con un volumen total de 200 ml, se muestran en la [tabla 1](#).

**Tabla 1:** Cantidad de extracto obtenido de 200 ml de medio de cada hongo.

| Hongos         | BPF4.1 | BPF9 | BPT4 | BPT6.2 | BPG1 | BPG5 | BPM6 |
|----------------|--------|------|------|--------|------|------|------|
| Extractos (mg) | 11,7   | 9,9  | 10   | 14,3   | 18,3 | 14,3 | 32   |

## 4.2 Resultados de actividad antialimentaria de *Myzus persicae*

El índice de inhibición de asentamiento (%SI) para cada extracto ensayado a una concentración de 10 mg/ml se muestra en la [tabla 2](#), donde se observa que los extractos de BPG5, BPF9 y BPF4.1 obtuvieron valores de %SI > 70% por lo que se sometieron a ensayos de dosis-respuesta para calcular sus dosis efectivas al 50% (CE<sub>50</sub>) dentro de unos límites superior e inferior de confianza del 95% ([Tabla 3](#)).

Los extractos de BPT4, BPT6.2, BPG1 y BPM6 no mostraron bioactividad en este ensayo por lo que fueron descartados como potenciales compuestos con actividad antialimentaria contra *Myzus persicae*.

**Tabla 2:** Índice de inhibición de asentamiento (%SI) de los extractos ensayados a 10 mg/ml ± error estándar.

| Hongos         | BPF4.1       | BPF9         | BPT4  | BPT6.2 | BPG1  | BPG5         | BPM6  |
|----------------|--------------|--------------|-------|--------|-------|--------------|-------|
| Promedio %SI   | <b>88,19</b> | <b>78,70</b> | 49,18 | 49,52  | 57,65 | <b>80,26</b> | 41,27 |
| ±              | ±            | ±            | ±     | ±      | ±     | ±            | ±     |
| Error estándar | <b>4,35</b>  | <b>9,32</b>  | 8,97  | 9,41   | 10,19 | <b>4,92</b>  | 10,48 |

**Tabla 3:** Índice de inhibición de asentamiento (%SI) de los extractos seleccionados ensayados a dosis de 10, 5 y 2,5 mg/ml ± error estándar. Dosis efectivas al 50% (CE<sub>50</sub>) con unos límites superior e inferior de confianza del 95%.

| Dosis (mg/ml)                     | Promedio %SI ± Error estándar |              |              |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                                   | BPF4.1                        | BPF9         | BPG5         |
| 10                                | 88,19 ± 4,35                  | 78,70 ± 9,32 | 80,26 ± 4,92 |
| 5                                 | 54,47 ± 8,68                  | 42,32 ± 9,44 | 52,32 ± 9,10 |
| 2,5                               | 28,08 ± 7,76                  | 26,03 ± 6,74 | 32,52 ± 6,55 |
| <b>CE<sub>50</sub> (mg/ml)</b>    | 4,28                          | 5,78         | 4,32         |
| <b>(límites de confianza 95%)</b> | (3,47-5,27)                   | (4,35-7,7)   | (3,38-5,53)  |

El cálculo de las dosis efectivas al 50% mostró que los extractos más activos son los pertenecientes a BPF4.1 y BPG5 dando valores de  $CE_{50}$  de 4,28 y 4,32 mg/ml respectivamente. Seguidos de BPF9 con un valor de  $CE_{50}$  de 5,78 mg/ml como se muestra en la [tabla 3](#).

Otro estudio demostró actividades similares sobre *Myzus persicae* de los extractos de un hongo endófito de la especie *Trichoderma* aislado de plantas medicinales de la familia *Lauraceae* [39]. Los extractos de este hongo estaban compuestos por una mezcla de ácidos grasos libres que al ser ensayados reflejaron unos valores de  $CE_{50}$  en torno a 7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . No obstante, los extractos de *Trichoderma* no fueron efectivos al ensayarlos contra *Meloidogyne javanica* ni contra *Botrytis cinerea* a diferencia de BPF4.1 que demostró actividad ante estos tres patógenos vegetales ([tablas 3, 5 y 6](#)) y BPG5 que fue activo contra dos de ellos, *M. persicae* y *M. javanica* ([tablas 3 y 5](#)).

También se han reportado sustancias elicitoras de proteínas extraídas de *Alternaria tenuissima*, como PeaT1, que son capaces de activar los mecanismos de resistencia sistémica adquirida de las plantas para protegerse de los daños causados por *M. persicae* [51].

Por otro lado, BPG5, sospechoso de ser un *Aspergillus* por su morfología observada en la [figura 3](#), se podría comparar con SPH2, otro *Aspergillus* endófito de *B. palmensis* aislado también del tallo en estudios anteriores [16]. Sin embargo, ambos mostraron actividades distintas en cada ensayo. BPG5 demostró gran actividad contra *M. persicae* y *M. javanica* ([tablas 3 y 5](#)) a diferencia de SPH2 que solo fue activo contra *B. cinerea*. Esto indica que a pesar de pertenecer al mismo género y haber sido aislados del tallo de la misma planta, se trata de hongos claramente diferentes.

### 4.3 Resultados de actividad nematicida frente a *Meloidogyne javanica*

Los efectos nematicidas de los extractos de cada hongo a una concentración de 1 mg/ml se muestran en la [tabla 4](#), donde se observa que BPF4.1 y BPT4 indujeron una mortalidad (M%) del 100% seguidos por BPG5 con una M% de 96,82%. Estos tres extractos se sometieron a ensayos de dosis-respuesta para calcular sus dosis efectivas letales al 50% y 90% ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ ) dentro de unos límites superior e inferior de confianza del 95% ([Tabla 5](#)).

Los extractos de BPF9, BPT6.2, BPG1 y BPM6 no mostraron un M% > 90% por lo que fueron descartados como potenciales compuestos con actividad nematocida frente a *Meloidogyne javanica*.

**Tabla 4:** Mortalidad (M%) de los extractos, expresada como porcentaje de juveniles J2 de *Meloidogyne javanica* muertos, ensayados a 1 mg/ml  $\pm$  error estándar.

| Hongos         | BPF4.1     | BPF9  | BPT4       | BPT6.2 | BPG1  | BPG5         | BPM6  |
|----------------|------------|-------|------------|--------|-------|--------------|-------|
| Promedio M%    | <b>100</b> | 17,58 | <b>100</b> | 18,22  | 19,67 | <b>96,82</b> | 11,42 |
| $\pm$          | $\pm$      | $\pm$ | $\pm$      | $\pm$  | $\pm$ | $\pm$        | $\pm$ |
| Error estándar | <b>0</b>   | 2,74  | <b>0</b>   | 2,40   | 2,70  | <b>1,05</b>  | 0,99  |

**Tabla 5:** Mortalidad (M%) de los extractos seleccionados ensayados a dosis de 1; 0,5; 0,25 y 0,125 mg/ml  $\pm$  error estándar. Dosis efectivas letales al 50% (CL<sub>50</sub>) y 90% (CL<sub>90</sub>) con unos límites superior e inferior de confianza del 95%.

| Dosis (mg/ml)                     | Promedio M% $\pm$ Error estándar |                  |                  |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------|
|                                   | BPF4.1                           | BPT4             | BPG5             |
| 1                                 | 100 $\pm$ 0                      | 100 $\pm$ 0      | 96,82 $\pm$ 1,05 |
| 0,5                               | 83,57 $\pm$ 3,48                 | 100 $\pm$ 0      | 44,23 $\pm$ 1,9  |
| 0,25                              | 11,55 $\pm$ 0,4                  | 71,81 $\pm$ 1,6  | 6,68 $\pm$ 1,2   |
| 0,125                             | 4,59 $\pm$ 0,85                  | 24,57 $\pm$ 1,79 | 3,43 $\pm$ 1,32  |
| <b>CL<sub>50</sub> (mg/ml)</b>    | 0,36                             | 0,186            | 0,53             |
| <b>(límites de confianza 95%)</b> | (0,35-0,37)                      | (0,18-0,19)      | (0,51-0,55)      |
| <b>CL<sub>90</sub> (mg/ml)</b>    | 0,55                             | 0,32             | 0,86             |
| <b>(límites de confianza 95%)</b> | (0,53-0,57)                      | (0,30-0,33)      | (0,82-0,90)      |

El cálculo de las dosis efectivas letales al 50% y 90% mostró que el extracto más activo es el perteneciente a BPT4 dando los valores de CL<sub>50</sub> (0,186 mg/ml) y CL<sub>90</sub> (0,32 mg/ml) más bajos y manteniendo un M% > 70% para las tres primeras dosis (1; 0,5; 0,25 mg/ml). El segundo extracto con mayor actividad pertenece a BPF4.1 con valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de 0,36 y 0,55 mg/ml respectivamente. Seguido de BPG5 que presenta un CL<sub>50</sub> de 0,53 mg/ml y un CL<sub>90</sub> de 0,86 mg/ml (Tabla 5).

Ya han sido reportados previamente algunos extractos producidos por hongos endófitos activos contra *Meloidogyne javanica* como es el caso de un extracto de *Guignardia mangiferae*, aislado de *Persea indica*, que mostró una fuerte actividad nematocida dando valores de M% del 100% a concentraciones de 1 mg/ml y valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de 0,44 y 0,9 mg/ml [44]. Resultados similares de M% a concentraciones de 1 mg/ml fueron

obtenidos con BPF4.1 y BPT4 pero sus valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> revelan una mayor bioactividad con respecto al extracto de *G. mangiferae*.

También se han identificado otros extractos procedentes de escarabajos que exhibe actividad contra *M. javanica* dando valores de CL<sub>50</sub> de 0,35 mg/ml y CL<sub>90</sub> de 0,65 mg/ml [45], valores similares a los obtenidos por BPF4.1.

Otros estudios han corroborado la potente actividad de aceites esenciales extraídos de diferentes plantas frente a este patógeno, destacando los de *Satureja montana* con valores de CL<sub>50</sub> de 0,041 mg/ml y CL<sub>90</sub> de 0,087 mg/ml [37]. Estos valores indican una mayor actividad de estos compuestos frente a los resultados obtenidos con los extractos de hongos endófitos. Para equiparar los resultados, sería necesario identificar y separar los compuestos responsables de la bioactividad en los extractos fúngicos y calcular sus dosis efectivas letales como compuestos aislados.

#### **4.4 Resultados de inhibición de germinación de *Botrytis cinerea***

La inhibición de germinación de las esporas de *Botrytis cinerea* se calculó como porcentaje de germinación de esporas en los tratamientos con sucesivas diluciones seriadas de cada extracto (800, 400, 200, 100 y 50 µg/ml), frente al porcentaje de germinación en el control (Tabla 6).

**Tabla 6:** Porcentaje de germinación respecto al control (%G) de los extractos a dosis de 800, 400, 200, 100 y 50 µg/ml ± estándar error. Dosis efectivas al 50% (CE<sub>50</sub>) de los extractos activos con unos límites superior e inferior de confianza del 95%.

| Dosis<br>(µg/ml)  | Promedio %G ± Error estándar |                      |                        |                      |                      |                    |                    |
|---|------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
|   | BPF4.1                       | BPF9                 | BPT4                   | BPT6.2               | BPG1                 | BPG5               | BPM6               |
| 800   | 20,5<br>±<br>1,3             | 76,59<br>±<br>8,54   | 16,64<br>±<br>0,99     | 88,24<br>±<br>7,9    | 113,10<br>±<br>16,16 | 51,76<br>±<br>3,22 | 69,54<br>±<br>3,29 |
| 400   | 21,3<br>±<br>1,5             | 113,7<br>±<br>9,7    | 20,16<br>±<br>1,74     | 109,73<br>±<br>24,63 | 135,74<br>±<br>15,43 | 52,06<br>±<br>3,37 | 71,19<br>±<br>5,6  |
| 200   | 39,27<br>±<br>3,34           | 113,45<br>±<br>9,88  | 23,72<br>±<br>2,27     | 162,42<br>±<br>26,71 | 143,30<br>±<br>13,32 | 68,24<br>±<br>5,16 | 72,04<br>±<br>4,3  |
| 100   | 57,28<br>±<br>3,67           | 158,02<br>±<br>13,89 | 29,47<br>±<br>4,61     | 191,89<br>±<br>39,84 | 193,69<br>±<br>17,05 | 69,73<br>±<br>5,93 | 78,14<br>±<br>3,97 |
| 50  | 69,13<br>±<br>6,46           | 173,16<br>±<br>18,09 | 68,6<br>±<br>9,02      | 204,48<br>±<br>16,94 | 207,49<br>±<br>20,58 | 70,82<br>±<br>4,42 | 80,59<br>±<br>3,71 |
| <b>CE<sub>50</sub> (µg/ml)</b><br><b>(límites de</b><br><b>confianza</b><br><b>95%)</b> | 128,5<br>(107,3-<br>152,7)   | -                    | 63<br>(33,5-<br>118,5) | -                    | -                    | -                  | -                  |

Como se observa en la [tabla 6](#), los extractos de BPT4 y BPF4.1 mostraron los porcentajes de germinación con respecto al control (%G) más bajos a la dosis de 800 µg/ml, dando valores de 16,64 y 20,5% respectivamente. Esto indica que ambos muestran una actividad inhibitoria de la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*. A medida que disminuye la dosis de extracto ensayado, el porcentaje de germinación con respecto al control va incrementando en ambos casos, por lo que va disminuyendo su actividad. No obstante, BPT4 demuestra una mayor continuidad de su actividad manteniéndose con valores de %G en torno a 20% en las tres primeras dosis (800, 400, 200 µg/ml) a diferencia de BPF4.1 que solo mantiene ese porcentaje en las dos primeras dosis (800, 400 µg/ml) y a partir de la tercera dosis (200 µg/ml) asciende a valores de %G en torno al 40%.

Los extractos del resto de hongos mostraron un %G > 50% a la dosis más alta (800 µg/ml) por lo que fueron descartados como potenciales compuestos con actividad inhibitoria de la germinación de *Botrytis cinerea*.

Las dosis efectivas de los extractos activos para lograr un 50% de inhibición (CE<sub>50</sub>) se calcularon mediante una regresión lineal de los porcentajes de germinación con respecto al control frente a los logaritmos de las dosis. Como se muestra en la [tabla 6](#), el extracto de BPT4 obtuvo un valor de CE<sub>50</sub> de 63 µg/ml dentro de (33,5-118,5) unos límites inferior y superior de confianza del 95% y el extracto de BPF4.1 obtuvo un valor de CE<sub>50</sub> de 128,5 µg/ml dentro de sus respectivos límites de confianza (107,3-152,7). Los resultados confirman que BPT4 presenta mayor actividad que BPF4.1 al tener una CE<sub>50</sub> más baja.

Estudios anteriores de extractos producidos por el hongo endófito SPH2 aislado del tallo de *B. palmensis* reportaron actividades antifúngicas a concentraciones similares de extractos, en este caso de inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea*, con valores de CE<sub>50</sub> de 40 y 220 µg/ml para extractos recuperados del medio de cultivo tras 3 y 13 días de fermentación respectivamente [\[16\]](#).

Otros estudios de extractos procedentes de *Echinopsis chiloensis*, un hongo endófito aislado del tallo de distintas plantas endémicas de la Precordillera Andina Central (Chile), demostraron inhibición tanto del crecimiento del micelio como de la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* [\[46\]](#).

En este mismo estudio, se observó que la inhibición del micelio de *B. cinerea* también se logró con extractos producidos por *Lithraea caustica* y *Acacia caven*, dos hongos filamentosos aislados de las hojas y el tallo respectivamente de las plantas endémicas de Chile mencionadas anteriormente. Estos dos hongos pertenecen al género *Alternaria*, especie a la cual se sospecha que pertenece el hongo BPT4 por su morfología observada en la [figura 3](#). Además, se han reportado muchas especies de *Alternaria* aisladas como endófitas que producen compuestos antifúngicos [\[47\]](#). Algunas de estas especies han mostrado gran actividad contra *B. cinérea* [\[48, 49\]](#). Con ello se relaciona el potencial de BPT4 para producir compuestos antifúngicos contra *Botrytis cinerea* gracias a los resultados de actividad mostrados en este estudio y, junto con su actividad nematicida frente a *Meloidogyne javanica* mostrada en el apartado anterior, se presenta como un posible candidato para la producción de bioplaguicidas a mayor escala.

Por otro lado, los extractos de BPF4.1 fueron los únicos que mostraron actividad en los tres ensayos realizados, demostrando su potencial tanto para inhibir la germinación de las esporas de *Botrytis cinerea* como antialimentaria de *Myzus persicae* y nematocida frente a *Meloidogyne javanica*. Esto lo sitúa como el hongo más prometedor, dentro de los 7 analizados en este estudio, para generar bioplaguicidas con amplio rango de acción. Quedarían pendientes ensayos de prevalencia en el medio y de fitotoxicidad con el fin de dilucidar si este extracto o sus compuestos activos son capaces de permanecer en el medio sin dañar los cultivos sobre los que se aplique.

No son numerosos los casos de hongos endófitos con un amplio rango de acción, pero sí se han reportado algunas especies de hongos, como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, que producen extractos con actividad dual contra *Myzus persicae* y *Botrytis cinerea* [50].

#### 4.5 Perfiles químicos de extractos bioactivos por GC/MS

La caracterización de los extractos que demostraron actividad en alguno de los ensayos (BPF4.1, BPT4, BPG5 y BPF9) se realizó utilizando sus espectros de masas y tiempos de retención para identificar los compuestos por comparación con los encontrados en la base de datos Wiley 275 y NIST 17.

La cuantificación de cada compuesto presente en el extracto viene determinada por los % de área relativos de todos los picos obtenidos en los cromatogramas.

En cada extracto se identificó una gran multitud de compuestos y se seleccionaron aquellos que presentaron un % área > 3% en uno o más extractos y un % similitud > 90% con los compuestos encontrados en las bases de datos (Tabla 7).

Cabe destacar que, debido a que algunos de los hongos de este trabajo podrían ser presumiblemente cepas nuevas de hongos, los compuestos que se identificaron con bajo porcentaje de similitud (% similitud < 90%) podrían ser compuestos nuevos [20], o bien derivados de los identificados que posean alguna de las actividades mencionadas anteriormente.



**Tabla 7:** Compuestos identificados por GC/MS de los extractos activos con su abundancia relativa en el extracto (% Área) y el tiempo de retención.

| Tiempo de retención (min) | % Área |        |       |      | Compuesto   |
|---------------------------|--------|--------|-------|------|---|
|                           | BPT4   | BPF4.1 | BPG5  | BPF9 |   |
| 4,96                      | 1,25   | 3,86   | 1,07  |      | Lactona mevalónica                                  |
| 11,40                     | 5,59   | 1,98   | 13,74 | 17   | Éster tetradecanílico del ácido acrílico            |
| 14,32                     | 10     | 3,95   |       |      | 1-Docosanol   |
| 15,12                     |        |        |       | 5,31 | 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil biciclo[4.3.0]nonano |
| 15,49                     | 2,23   | 2,20   | 1,73  | 4,32 | Ácido palmítico                                     |
| 16,99                     | 4,17   | 7,37   | 2,23  | 3,7  | Cis-9-octadecen-1-ol                                |
| 17,26                     | 5,47   | 4,96   | 3,9   | 1,7  | 1-Octadecanol                                       |
| 17,79                     |        | 4,86   |       |      | Palmitato de metilo                                 |
| 18,32                     |        |        |       | 3,8  | Ácido esteárico                                     |
| 18,54                     | 1,53   | 3,05   | 2,9   | 2,07 | Amida del ácido n-tetradecanoico                    |
| 20,89                     | 24,4   | 35,19  | 41,1  | 25   | Oleamida  |

La oleamida fue el compuesto con mayor abundancia presente en todos los extractos activos. Se trata de una amida derivada de ácidos grasos que ha sido reportada en estudios previos como un potente agente hipolipidémico, eficaz para disminuir los niveles séricos de triglicéridos y colesterol [52]. Este compuesto ha sido aislado de muchas plantas mostrando una actividad inhibitoria significativa contra patógenos humanos como *Microcystis aeruginosa*, una cianobacteria de agua dulce conocida por producir toxinas letales [53]. También se ha obtenido oleamida de *Botryodiplodia theobromae*, un hongo endófito aislado de la planta *Dracaena draco*, cuyos extractos demostraron tener amplia actividad antimicrobiana [54]. El mecanismo de acción de la oleamida no se conoce completamente, pero se piensa que induce estrés en las membranas celulares, aumentando su fluidez y fuga de componentes intracelulares lo que causa la destrucción de los microbios [55]. Sin embargo, no se han reportado hasta la fecha los efectos de la oleamida contra las plagas ensayadas en este estudio.

Otros compuestos presentes en todos los extractos son el éster tetradecanílico del ácido acrílico, el 1-octadecanol, el cis-9-octadecen-1-ol y la amida del ácido n-tetradecanoico. No hay información acerca de estos compuestos en las dianas ensayadas, pero algunos de ellos han reportado otras actividades biológicas. Por ejemplo, el éster tetradecanílico del ácido acrílico, principalmente abundante en los extractos de BPG5 y BPF9, ha sido aislado también del hongo endófito *Fusarium equseti*, exhibiendo actividades

anticancerígenas en líneas celulares de cáncer de mama y antimicrobianas contra *Candida tropicalis* y *Candida albicans* [56]. El 1-octadecanol, más conocido como alcohol estearílico, extraído de multitud de actinomicetos, presenta actividad antiinflamatoria y antipirética [57].

También se han identificado combinaciones de estos compuestos con potencial plaguicida frente a otras dianas de insectos y hongos patógenos de plantas. Un extracto compuesto por 1-octadecanol y 1-docosanol de *Aspergillus nidulans*, un endófito de *Lantana cámara*, reportó actividad insecticida contra *Spodoptera littoralis*, un insecto polífago muy destructivo [58]. Estos compuestos se encontraron juntos en los extractos de BPT4 y BPF4.1.

Por otra parte, el 1-octadecanol y el cis-9-octadecen-1-ol (alcohol oleico) se encontraron en extractos de ajo y reportaron inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, un hongo patógeno de plantas [59]. Ambos compuestos estuvieron presentes en todos los extractos bioactivos con mayor abundancia en BPT4 y BPF4.1, los mismos que demostraron actividad contra *B. cinerea* en este estudio.

El 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutil biciclo[4.3.0]nonano (DDIBN), se encontró exclusivamente en el extracto de BPF9. Otros estudios reportaron la actividad antioxidante de este compuesto [60]. El DDIBN también se ha aislado de actinomicetos endófitos de la especie *Nocardiosis* demostrando una excelente actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* al inhibir sus beta-lactamasas de espectro extendido [61].

Pese a todas las actividades descritas de cada compuesto, no hay información de ninguno de los identificados en los extractos que hayan mostrado previamente actividad contra *Meloidogyne javanica* o contra *Botrytis cinerea*, y solo tres de ellos se han reportado previamente como bioactivos contra *Myzus persicae*. Estos fueron el palmitato de metilo [43] y una mezcla de ácidos grasos entre los que destacan el ácido palmítico y esteárico [39]. El palmitato de metilo estuvo presente en el extracto de BPF4.1 y el ácido palmítico y esteárico se encontraron juntos en el extracto de BPF9. Ambos extractos fueron activos contra *Myzus persicae* en este estudio, pudiendo ser estos compuestos los responsables de su actividad. Se desconoce el modo de acción de los ácidos grasos como biomolécula antialimentaria de insectos, pero se sabe que son los principales componentes de los lípidos en las plantas y pueden afectar a la idoneidad del huésped para los insectos

invasores [40]. Por ejemplo, otros ácidos grasos como son el linolénico y linoleico también se han reportado como potentes antialimentarios contra *M. persicae* [41]. Por otra parte, el ácido palmítico y esteárico demostraron, en otro estudio similar, efectos como antialimentadores para el escarabajo de la patata de Colorado [42]. Por lo tanto, los ácidos grasos son moléculas prometedoras para el control de insectos fitófagos.

En resumen, los compuestos responsables de las actividades obtenidas en este estudio podrían ser cualquiera de los presentes en los extractos o mezclas de ellos que generan sinergia entre sí. Sería necesario aislar estos compuestos y ensayarlos de forma individual sobre cada diana para identificar de forma precisa los responsables de la actividad nematocida, fungicida y antialimentaria de insectos.

Una vez que se hayan determinado los compuestos responsables de la bioactividad, con el objetivo de optimizar su producción para escalarlos a nivel industrial, podría estudiarse el uso de distintos medios de cultivo en la fermentación de cada hongo. La adición de precursores de estos compuestos al medio de cultivo es otra estrategia prometedora para aumentar el rendimiento de producción del metabolito deseado [38].

## 5. CONCLUSIÓN

En este estudio se ha medido la bioactividad de los extractos obtenidos de 7 hongos endófitos de la planta *Bethencourtia palmensis* frente a 3 plagas importantes en la agricultura (*Myzus persicae*, *Meloidogyne javanica* y *Botrytis cinerea*).

Los resultados de este estudio indican que los extractos de BPG5 demostraron actividad contra *M. persicae* y *M. javanica*, los extractos de BPT4 mostraron efectividad contra *M. javanica* y *B. cinerea*, los extractos de BPF4.1 fueron activos contra *M. persicae*, *M. javanica* y *B. cinerea* y los de BPF9 contra *M. persicae* exclusivamente. Por lo tanto, estos 4 hongos son los que mayor potencial presentan para la producción de bioplaguicidas y se pueden emplear como una herramienta biotecnológica para la producción de compuestos con efectos antialimentarios de insectos, nematocidas y fungicidas.

Los extractos activos fueron caracterizados parcialmente por GC/MS identificándose una multitud de compuestos en cada uno y destacando la oleamida por su abundancia en todos ellos. Para determinar los principales compuestos responsables de la bioactividad sería necesario llevar a cabo un fraccionamiento guiado del metabolismo de cada hongo con el fin de aislar los compuestos y ensayarlos de forma individual.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson, D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*. 1995; 73(2), 274–276. <https://doi.org/10.2307/3545919>
2. Bacon, C.W.; White, J.F. Microbial Endophytes. 1<sup>st</sup> Edition. Boca Raton (Florida): *CRC Press*. 2000. <https://doi.org/10.1201/9781482277302>
3. Morales-Sánchez, V.; Fe Andrés, M.; Díaz, C. E.; González-Coloma, A. Factors Affecting the Metabolite Productions in Endophytes: Biotechnological Approaches for Production of Metabolites. *Current medicinal chemistry*. 2020; 27(11), 1855–1873. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190626154421>
4. Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*. 2006; 23(5), 753–771. <https://doi.org/10.1039/b609472b>
5. Clay, K.; Schardl, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American naturalist*. 2002; 160(S4), S99–S127. <https://doi.org/10.1086/342161>
6. Schulz, B.; Boyle, C. What are Endophytes?. En: Microbial Root Endophytes. Berlin (Heidelberg): *Springer*. 2006; 9, 1-13. [https://dx.doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_1](https://dx.doi.org/10.1007/3-540-33526-9_1)
7. Germaine, K.; Keogh, E.; Garcia-Cabellos, G.; Borremans, B.; Lelie, D.; Barac, T.; Oeyen, L.; Vangronsveld, J.; Moore, F. P.; Moore, E. R.; Campbell, C. D.; Ryan, D.; Dowling, D. N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS microbiology ecology*. 2004; 48(1), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.009>
8. Strobel, G.; Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2003; 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
9. Wang, Y.; Dai, CC. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*. 2011; 61, 207–215. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0120-6>
10. Guo, B.; Wang, Y.; Sun, X.; Tang, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 2008; 44(2), 153–158.

11. Andrés, M.F.; Diaz, C.E.; Giménez, C.; et al. Endophytic fungi as novel sources of biopesticides: the Macaronesian Laurel forest, a case study. *Phytochemistry Reviews*. 2017; 16, 1009–1022. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9514-4>
12. Alvin, A.; Miller, K. I.; Neilan, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological research*. 2014; 169(7-8), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.009>
13. Firáková, S.; Šturdíková, M.; Múčková, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*. 2007; 62, 251–257. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0044-1>
14. Kharwar, R. N.; Mishra, A.; Gond, S. K.; Stierle, A.; Stierle, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural product reports*. 2011; 28(7), 1208–1228. <https://doi.org/10.1039/c1np00008j>
15. Chen, L.; Zhang, Q. Y.; Jia, M.; Ming, Q. L.; Yue, W.; Rahman, K.; Qin, L. P.; Han, T. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Critical reviews in microbiology*. 2016; 42(3), 454–473. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.959892>
16. Morales-Sánchez, V.; Díaz, C. E.; Trujillo, E.; Olmeda, S. A.; Valcarcel, F.; Muñoz, R.; Andrés, M. F.; González-Coloma, A. Bioactive Metabolites from the Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. SPH2. *Journal of fungi*. 2021; 7(2), 109. <https://doi.org/10.3390/jof7020109>
17. González-Coloma, A.; Cosoveanu, A.; Cabrera, R.; Giménez, C.; Kaushik, N. Endophytic Fungi and Their Bioprospection. En: *Fungi. Applications and Management Strategies*. CRC Press. 2016; 18. <https://doi.org/10.1201/9781315369471-2>
18. Pimentel, M. R.; Molina, G.; Dionísio, A. P.; Maróstica Junior, M. R.; Pastore, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology research international*. 2011; 2011, 576286. <https://doi.org/10.4061/2011/576286>
19. Kumar, S.; Aharwal, R. P.; Shukla, H.; Rajak, R. C.; Sandhu S. S. Endophytic fungi: as a source of antimicrobials bioactive compounds. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 3(2), 1179–1197. [[Google Scholar](#)]

20. Nisa, H.; Kamili, A. N.; Nawchoo, I. A.; Shafi, S.; Shameem, N.; Bandh, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial pathogenesis*. 2015; 82, 50–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.04.001>
21. Kaul, S.; Ahmed, M.; Sharma, T.; Dhar, M. Unlocking the Myriad Benefits of Endophytes: An Overview. En: *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer: New Delhi. 2014; 41-57.  
[https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_4)
22. Higginbotham, S. J.; Arnold, A. E.; Ibañez, A.; Spadafora, C.; Coley, P. D.; Kursar, T. A. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. *PloS one*. 2013; 8(9), e73192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073192>
23. Harrison, J. G.; Griffin, E. A. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here?. *Environmental microbiology*. 2020; 22(6), 2107–2123.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>
24. The Macaronesian Region. Disponible en:  
[https://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/biogeog\\_regions/macaronesian/index\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/biogeog_regions/macaronesian/index_en.htm) (consultado el 13 de abril de 2022).
25. Rodilla, J. M.; Tinoco M. T.; Morais J. C.; Gimenez C.; et al. *Laurus novocanariensis* essential oil: seasonal variation and valorization. *Biochemical Systematics Ecology*. 2008; 36(3), 167–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.09.001>
26. Fraga, B. M.; Díaz, C. E.; Amador, L. J.; Reina, M.; Santana, O.; González-Coloma, A. Bioactive compounds from transformed root cultures and aerial parts of *Bethencourtia hermosae*. *Phytochemistry*. 2014; 108, 220–228.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.010>
27. Portero, A.G.; González-Coloma, A.; Reina, M.; et al. Plant-defensive sesquiterpenoids from *Senecio* species with biopesticide potential. *Phytochemistry Reviews*. 2012; 11, 391–403.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-013-9279-3>
28. Nordenstam, B. *Canariothamnus B. Nord.*, a new genus of the Compositae-Senecioneae, endemic to the Canary Islands. *Compositae Newslett*. 2006; 44, 24-31.

29. Capinera, J. L. Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Insecta: Hemiptera: Aphididae): EENY222/IN379, rev. 7/2004. *EDIS*. 2004; 2004(6).  
<https://doi.org/10.32473/edis-in379-2004>
30. Elling, A. A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*. 2013; 103(11), 1092–1102.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW>
31. Niu, J. H.; Guo, Q. X.; Jian, H.; Chen, C. L.; Yang, D.; Liu, Q.; Guo, Y. D. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection*. 2011; 30(8), 1063-1069. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.028>
32. Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P.; Delen, N. *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems – An Introduction. En: *Botrytis: biology, pathology and control*. Berlin/Germany: *Springer*. 2007; 1-8.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_1)
33. Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; van Kan, J. A. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*. 2007; 8(5), 561–580.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
34. Zhang, G.; Lu, F.; Huang, Z. G.; Chen, S.; Wang, X. K. [Estimations of application dosage and greenhouse gas emission of chemical pesticides in staple crops in China.]. *The journal of applied ecology*. 2016; 27(9), 2875–2883.  
<https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.201609.031>
35. Gutiérrez, C.; Fereres, A.; Reina, M.; et al. Behavioral and Sublethal Effects of Structurally Related Lower Terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology*. 1997; 23(6), 1641–1650.  
<https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006428.00568.c5>
36. Finney, D. J.; Probit Analysis. *Cambridge University Press*. 1972; 14(1), 72.  
<https://doi.org/10.1002/bimj.19720140111>
37. Andrés, M.F.; González-Coloma, A.; Sanz, J.; et al. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2012; 11, 371–390.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-012-9263-3>
38. Morales-Sánchez, V.; Fe Andrés, M.; Díaz, C.E.; González-Coloma, A. Factors Affecting the Metabolite Productions in Endophytes: Biotechnological Approaches for Production of Metabolites. *Current Medicinal Chemistry*. 2020; 27(11), 1855-1873. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190626154421>



39. Kaushik, N.; Díaz, C.E.; Chhipa, H.; Julio, L.F.; Andrés, M.F.; González-Coloma, A. Chemical Composition of an Aphid Antifeedant Extract from an Endophytic Fungus, *Trichoderma* sp. EFI671. *Microorganisms*. 2020; 8(3), 420.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030420>
40. Ishangulyyeva, G.; Najar, A.; Curtis, J.M.; Erbilgin, N. Fatty Acid Composition of Novel Host Jack Pine Do Not Prevent Host Acceptance and Colonization by the Invasive Mountain Pine Beetle and Its Symbiotic Fungus. *PLoS One*. 2016; 11(9), e0162046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162046>
41. Castillo, L.; Díaz, M.; González-Coloma, A.; González, A.; Alonso-Paz, E.; Bassagoda, M.J.; Rossini, C. *Clytostoma callistegioides* (Bignoniaceae) wax extract with activity on aphid settling. *Phytochemistry*. 2010; 71(17-18), 2052-2057. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.016>
42. Suqi, L.; Cáceres, L.A.; Schieck, K.; McGarvey, B.D.; Booker, C.J.; Yeung, K.K.; Pariente, S.; Briens, C.; Berruti, F.; Scott, I.M. Insecticidal activity of bio-oil from the pyrolysis of straw from *Brassica* spp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2014; 62(16), 3610-3618. <https://doi.org/10.1021/jf500048t>
43. Santana, O.; Reina, M.; Fraga, B.M.; Sanz, J.; González-Coloma, A. Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*. *Chemistry & Biodiversity*. 2012; 9(3), 567-576. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100083>
44. González-Coloma, A.; Diaz, C.E.; Andres, M.F.; Fraga, M.; et al. Biocidal products and use thereof for controlling phytopathogens and pest organism that harm plants. 2016; PCT Patent WO 2016/034751 A1.
45. Díaz-Navarro, M.; Bolívar, P.; Andrés, M.F.; Gómez-Muñoz, M.T.; Martínez-Díaz, R.A.; Valcárcel, F.; García-París, M.; Bautista, L.M.; González-Coloma, A. Antiparasitic Effects of Potentially Toxic Beetles (Tenebrionidae and Meloidae) from Steppe Zones. *Toxins*. 2021; 13(7), 489.  
<https://doi.org/10.3390/toxins13070489>
46. Vidal, A.; Parada, R.; Mendoza, L.; Cotoras, M. Endophytic Fungi Isolated from Plants Growing in Central Andean Precordillera of Chile with Antifungal Activity against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*. 2020; 6(3), 149.  
<https://doi.org/10.3390/jof6030149>
47. Lou, J.; Fu, L.; Peng, Y.; Zhou, L. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*. 2013; 18(5), 5891–5935.  
<https://doi.org/10.3390/molecules18055891>

48. Chowdhary, K.; Kaushik, N. Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLoS One*. 2015; 10(11), e0141444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141444>
49. Cosoveanu, A.; Cabrera, Y.; Hernandez, G.; Cabrera, R. Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopathogenic fungi. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2014; 7, 1497–1503.
50. Yun, H.G.; Kim, D.J.; Gwak, W.S.; Shin, T.Y.; Woo, S.D. Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Mycobiology*. 2017; 45(3), 192-198. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.3.192>
51. Basit, A.; Farhan, M.; Abbas, M.; Wang, Y.; Zhao, D. G.; Mridha, A. U.; Al-Tawaha, A.; Bashir, M. A.; Arif, M.; Ahmed, S.; Alajmi, R. A.; Metwally, D. M.; El-Khadragy, M. Do microbial protein elicitors PeaT1 obtained from *Alternaria tenuissima* and PeBL1 from *Brevibacillus laterosporus* enhance defense response against tomato aphid (*Myzus persicae*)?. *Saudi journal of biological sciences*. 2021; 28(6), 3242–3248. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.063>
52. Cheng, M. C.; Ker, Y. B.; Yu, T. H.; Lin, L. Y.; Peng, R. Y.; Peng, C. H. Chemical synthesis of 9(Z)-octadecenamide and its hypolipidemic effect: a bioactive agent found in the essential oil of mountain celery seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010; 58(3), 1502–1508. <https://doi.org/10.1021/jf903573g>
53. El-Moez, S. I. A.; Abdelmonem, M. A.; Gomaa, A. M.; et al. In vitro antibacterial activities of dietary medicinal ethanolic extracts against pathogenic reference strains of animal origin. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; 7(46), 5261-5270. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5477>
54. Zaher, A. M.; Moharram, A. M.; Davis, R.; Panizzi, P.; Makboul, M. A.; Calderón, A. I. Characterisation of the metabolites of an antibacterial endophyte *Botryodiplodia theobromae* Pat. of *Dracaena draco* L. by LC-MS/MS. *Natural product research*. 2015; 29(24), 2275–2281. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1012715>
55. Shao, J.; He, Y.; Li, F.; Zhang, H.; Chen, A.; Luo, S.; Gu, J. D. Growth inhibition and possible mechanism of oleamide against the toxin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *Ecotoxicology*. 2016; 25(1), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1582-x>

56. Venkateswarulu, N.; Chari, P.V.B.; Nagaraju, C.; Vijaya, T. Isolation and purification of (E)-3-(2, 3-dihydroxyphenyl) acrylic acid from endophytic fungi *Fusarium equseti* EF-32 and its anti-candidal and anticancer activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2017; 11, 294-301.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.017>
57. Kumari, N.; Menghani, E.; Mithal, R. Bioactive compounds characterization and antibacterial potentials of actinomycetes isolated from rhizospheric soil. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2019; 78(11), 793–798.
58. Ashraf, S.A.; El-Sayed, Ahmed H.; Moustafa, Aly A.; El-Sheikh, Amgad M.; Rady, Nahla A.M.; Fathy, Hussein A.; Hussein, Gamal Enan; Marwa A. Yassin. Efficient biocontrol of *Spodoptera littoralis* by *Aspergillus nidulans*, an endophyte of *Lantana camara*. *International Journal of Pest Management*. 2021; 67(4), 298-305. <https://doi.org/10.1080/09670874.2020.1771472>
59. de Guzman Alvindia, D.; Mangoba, M. Bioactivities of *Allium longicuspis* Regel against anthracnose of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Scientific reports*. 2020; 10(1), 11367.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68399-z>
60. da Rosa, B. V.; Kuhn, K. R.; Ugalde, G. A.; Zabet, G. L.; Kuhn, R. C. Antioxidant compounds extracted from *Diaporthe schini* using supercritical CO<sub>2</sub> plus cosolvent. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2020; 43(1), 133–141.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02211-9>
61. Rajivgandhi, G.; Ramachandran, G.; Maruthupandy, M.; Vaseeharan, B.; Manoharan, N. Molecular identification and structural characterization of marine endophytic actinomycetes *Nocardiopsis* sp. GRG 2 (KT 235641) and its antibacterial efficacy against isolated ESBL producing bacteria. *Microbial pathogenesis*. 2019; 126, 138–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.014>