

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA, BACTERICIDA Y
ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS EXTRAÍDOS DE HONGOS
ENDÓFITOS**

Carlos García Latorre Nieto

Badajoz, junio 2017

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA, BACTERICIDA
Y ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS EXTRAÍDOS
DE HONGOS ENDÓFITOS**

AUTOR:

DIRECTOR/ES:

Director

Codirector

Fdo:.....

Fdo:.....

TRIBUNAL CALIFICADOR:

Vocal

Presidente

Secretario

Fdo.:_____

Fdo.:_____

Fdo.:_____

Fecha lectura:

ÍNDICES

ÍNDICE

Resumen	2
Introducción	5
1.1 Los sistemas agroforestales. El Caso de la Dehesa	5
1.1.1 Los sistemas agroforestales y los servicios ecosistémicos	5
1.1.2 El sistema Dehesa	8
1.1.3 La mejora de la dehesa. El biocontrol.....	10
1.2 Los hongos endófitos.....	11
1.3 Los metabolitos secundarios.....	15
1.4 Bioactividad. Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana	20
Objetivos	23
Material y Métodos	25
3.1 Selección de los hongos endófitos.....	25
3.2 Cultivo y obtención del filtrado.....	26
3.3 Obtención del extracto crudo.....	27
3.4 Evaluación de la actividad antioxidante.	27
3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	28
3.6 Ensayo de bioactividad dirigida del extracto crudo para la identificación de los metabolitos causantes del efecto antimicrobiano.	30
3.7 Identificación química de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana...	32
Resultados y Discusión	35
4.1 Condiciones de cultivo. Rendimiento.....	35
4.2 Actividad Antioxidante.....	36
4.3 Actividad antimicrobiana	40
4.4 Ensayo de bioactividad dirigida del extracto crudo.....	41
4.5 Identificación química de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana...	43
Conclusiones	56
Bibliografía.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 Principales servicios ecosistémicos asociados a los sistemas agroforestales frente a sistemas intensivos 8

TABLA 1.2 Criterios de división de los hongos endófitos 12

TABLA 3.1 Clasificación taxonómica de los hongos en estudio 25

TABLA 3.2 Condiciones establecidas para el crecimiento de los endófitos 26

TABLA 3.3 Parámetros del HPLC utilizados para el semi-fraccionamiento de los extractos crudos 31

TABLA 4.1 Condiciones y resultados del crecimiento de los hongos endófitos..... 35

TABLA 4.2 Valores de absorbancia e IC del ácido ascórbico..... 37

TABLA 4.3 Valores de absorbancia e IC del extracto crudo obtenido a partir del hongo 13838

TABLA 4.4 Capacidad de inhibición del crecimiento de patógenos mostrada por los hongos endófitos 41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Principales servicios ecosistémicos asociados a los sistemas agroforestales y su frecuencia de aparición en 71 publicaciones relacionadas	7
FIGURA 1.2 Distribución espacial de los sistemas agroforestales en España	9
FIGURA 1.3 Factores que afectan a los endófitos (Adaptado de Eljounaidi et al., 2016)	14
FIGURA 1.4 Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por hongos	16
FIGURA 1.5 Ejemplo de regulación de la producción de metabolitos secundarios en función de factores ambientales	17
FIGURA 1.6 Resumen esquemático de la obtención de metabolitos bioactivos a partir de microorganismos endófitos.	18
FIGURA 3.1 Esquema de las placas utilizadas para la determinación de la CMI.....	30
FIGURA 4.1 Curva de IC del ácido ascórbico.....	38
FIGURA 4.2 Curva de IC del extracto crudo del hongo 138.....	39
FIGURA 4.3 Actividad inhibitoria mostrada por ambos hongos frente a los patógenos.....	40
FIGURA 4.4 Pocillos con actividad inhibitoria del semi-fraccionado del extracto crudo del hongo 138.....	42
FIGURA 4.5 Pocillos con actividad inhibitoria del semi-fraccionado del extracto crudo del hongo 234.....	42
FIGURA 4.6 Cromatograma de espectro ultravioleta (DAD) del hongo 138	43
FIGURA 4.7 Cromatograma de masas positivo del hongo 138.....	44
FIGURA 4.8 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 15,043 minutos (138)	44
FIGURA 4.9 Cromatogramas de masas positivo (superior) y negativo (inferior) para el tiempo de retención estimado (Hongo 138)	45
FIGURA 4.10 Cromatograma de masas para el tiempo de retención 15,617 minutos mediante HPLC Q-TOF.....	46
FIGURA 4.11 Posibles fórmulas moleculares del metabolito para la masa dada (138).....	46
FIGURA 4.12 Estructura química del metabolito identificado a partir del hongo 138	47
FIGURA 4.13 Cromatograma de espectro ultravioleta (DAD) del hongo 234	47
FIGURA 4.14 Cromatograma de masas del hongo 234.....	48
FIGURA 4.15 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 21,183 minutos (234)	49
FIGURA 4.16 Cromatogramas de masas positivo (superior) y negativo (inferior) para el tiempo de retención estimado de 21,3 minutos (Hongo 234)	49

FIGURA 4.17 Cromatograma de masas para el tiempo de retención 22,278 minutos mediante HPLC Q-TOF 50

FIGURA 4.18 Posibles fórmulas moleculares del metabolito para la masa dada (234) 51

FIGURA 4.19 Estructura química del metabolito identificado a partir del hongo 234 51

FIGURA 4.20 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 25,396 minutos (234) 52

FIGURA 4.21 Cromatogramas de masas positivo (superior) y negativo (inferior) para el tiempo de retención estimado de 25,7 minutos (Hongo 234) 53

FIGURA 4.22 Cromatograma de masas para el tiempo de retención 25,540 minutos mediante HPLC Q-TOF 53

FIGURA 4.23 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 34,363 minutos (234) 54

RESUMEN

RESUMEN

La dehesa, uno de los sistemas agroforestales más representativos de Europa, presenta un alto valor medioambiental ligado a su equilibrio entre producción y conservación. Por ello, gran parte de los esfuerzos orientados a su preservación se centran en la búsqueda de técnicas que favorezcan su desarrollo sostenible. Con este fin, se consideró el potencial de los hongos endófitos como elemento de biocontrol. Este interés se explica por la relación simbiótica que pueden establecer con una amplia variedad de plantas, asociada normalmente a algún tipo de actividad biológica por parte del hongo, que permitiría estimular el estado general de éstas, así como su resistencia frente a condiciones adversas. Dado que, frecuentemente, dicha bioactividad es consecuencia de la acción de los metabolitos secundarios producidos por cada hongo, estos fueron el objetivo principal del ensayo. Para ello, se procedió al cultivo *in vitro* de dos hongos, *Embellisia leptinellae* y otro hongo perteneciente al orden Pleosporales, denominados por los códigos 138 y 234, respectivamente. Dichos hongos fueron seleccionados en base a resultados preliminares prometedores obtenidos de proyectos previos. Una vez llevada a cabo la fermentación, se procedió a la extracción de los metabolitos producidos, con el objetivo de evaluar su bioactividad, centrada en su capacidad antioxidante y antimicrobiana. La primera se estimó en base al método de captura de radicales libres (DPPH), mostrando el hongo *E. leptinellae* (138) una actividad razonable (IC₅₀: 201,18 µg mL⁻¹). Por su parte, la actividad antimicrobiana se midió a través de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ambos extractos crudos frente al crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Botrytis cinerea*. En este caso, el hongo 234 (Pleosporales) mostró una inhibición frente a ambos patógenos mayor (37,50 µg mL⁻¹) que el 138 (150 µg mL⁻¹). Ambos hongos presentaron la misma capacidad de inhibir tanto al patógeno de origen bacteriano como al de origen fúngico.

ABSTRACT

The dehesa, one of the most representative agroforestry systems in Europe, has a great environmental value, linked to its balance between production and preservation. For this reason, much of the efforts aimed to its preservation focus on the search for techniques that favor its sustainable development. For this purpose, the potential of endophytic fungi as a biocontrol tool was considered. This can be explained by the symbiotic relationship that these fungi may establish with a wide range of plants, usually associated with some kind of bioactivity by the fungal partner, which would stimulate the general status of the plant as well as their resistance to adverse conditions. Since this bioactivity is usually the result of the action of the secondary metabolites produced by the fungi, these were the central aim of this work. To do this, 2 fungi, *Embellisia leptinellae* and another fungus belonging to Pleosporales, designated by the codes 138 and 234 respectively, were cultured *in vitro*. Both fungi were chosen based on promising preliminary results from previous projects. Once the fermentation was carried out, the metabolites produced were extracted, in order to evaluate their bioactivity through their antioxidant and antimicrobial capacity. The first one was estimated using DPPH radical scavenging assay, showing *E. leptinellae* (138) a reasonable activity (IC_{50} : 201,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$). On the other hand, the antimicrobial activity was assessed as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of both crude extracts against the growth of *Bacillus subtilis* and *Botrytis cinerea*. In this case, the fungus 234 (Pleosporales) showed an inhibition against both pathogens greater ($37,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) than the fungus 138 ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$). Also, both fungi had the same ability to inhibit both, bacterial and fungal, pathogens.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LOS SISTEMAS AGROFORESTALES EN EXTREMADURA

1.1 Los sistemas agroforestales. El Caso de la Dehesa

1.1.1 Los sistemas agroforestales y los servicios ecosistémicos

La agricultura europea lleva tiempo enfrentándose a diversos problemas que, en su mayor parte, están íntimamente ligados a su intensificación (Comisión Europea, 2006). Cuestiones como la sobreproducción, los bajos ingresos de los agricultores, el abandono de las zonas rurales, la contaminación o la pérdida de biodiversidad (Palma *et al.*, 2007; Plieninger *et al.*, 2015) han obligado a buscar alternativas que puedan ser más sostenibles en el largo plazo.

En este sentido, la reorientación de la producción hacia sistemas agroforestales y silvopastorales se revela como una opción más que viable, ya que implica un manejo más eficiente de los recursos disponibles (Nair, 1993; Keesman *et al.*, 2011) que puede redundar en un beneficio no solo medioambiental, sino también económico.

Estos sistemas agroforestales se caracterizan por integrar el manejo de los recursos leñosos con el estrato herbáceo, de tal forma que generalmente su aprovechamiento es realizado por el ganado (Mosquera-Losada *et al.*, 2009; Cabbage *et al.*, 2012). Así, son las interacciones que se generan si los estratos arbóreo, arbustivo y herbáceo se combinan favorablemente junto con el ganado, las que permiten avanzar en la conservación y protección del medio (Smith *et al.*, 2013). Como consecuencia de ello, este tipo de sistemas, así como sus prácticas asociadas, han tenido una gran importancia histórica en toda Europa. Si bien es cierto que, durante el siglo XX, y debido a cambios socioeconómicos, fueron desapareciendo y dando paso al abandono de tierras o a la intensificación agrícola en las zonas donde esto fue posible (Nerlich *et al.*, 2013).

En muchos casos, este abandono se ha visto acelerado por las políticas públicas, especialmente la PAC, que ha favorecido la adopción de otros sistemas de producción más especializados, y por tanto más rentables (Van Zanten *et al.*, 2013). Sin embargo, la necesidad

de atajar los problemas que esto ha acabado originando, junto con los servicios ecosistémicos que proporcionan, ha movido a que en los últimos tiempos hayan ido apareciendo diferentes líneas de investigación y financiación para apoyar el resurgir de los sistemas agroforestales (Unión Europea, 2013).

Según Primdahl *et al.* (2013), los sistemas agroforestales tienen potencial suficiente a nivel económico para favorecer un desarrollo rural más sostenible en Europa. Además, estos sistemas permiten beneficiar no solo a los propietarios de las tierras, sino a la sociedad en su conjunto, al conseguir equilibrar productividad y protección ambiental a través de los servicios ecosistémicos (Smith *et al.*, 2013; Fagerholm *et al.*, 2016).

El concepto de servicio ecosistémico hace referencia al hecho de que los sistemas productivos pueden proveer una amplia variedad de beneficios importantes para el ser humano, que pueden incluso ayudar a revertir la degradación de los ecosistemas (Daily, 1997; Haines-Young y Potschin, 2010).

Entre los beneficios de los sistemas agroforestales destacan aquellos de carácter agroambiental, como la mayor retención de nutrientes, el control de la erosión, el secuestro del carbono, la reducción de incendios o la explotación de recursos marginales (Nair *et al.*, 2009; Kremen *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013). Es importante resaltar también que la adopción de estos sistemas contribuye a mantener el potencial productivo comunitario de forma sostenible, en consonancia con el objetivo europeo del mantenimiento de la Seguridad Alimentaria (Food Security) (Kastner *et al.*, 2012).

De la misma forma, existen otros servicios de carácter social y cultural, como las posibilidades de ocio y turismo, el valor paisajístico y estético o la preservación del patrimonio cultural (McAdam *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2012; Tsonkova *et al.*, 2012).

En la FIGURA 1.1 se presentan, a modo de resumen, los principales servicios ecosistémicos que la literatura científica asocia a las prácticas agroforestales, recogidos por Fagerholm *et al.* (2016). Los beneficios estudiados quedan clasificados en cuatro categorías según su impacto sobre el entorno: de aprovisionamiento, reguladores, culturales y de soporte o apoyo. Del gráfico puede extraerse la gran importancia de estos sistemas como sostenedores de la biodiversidad, por ser fuente de recursos o como reguladores del clima.

Principales Servicios ecosistémicos asociados a los Sistemas Agroforestales

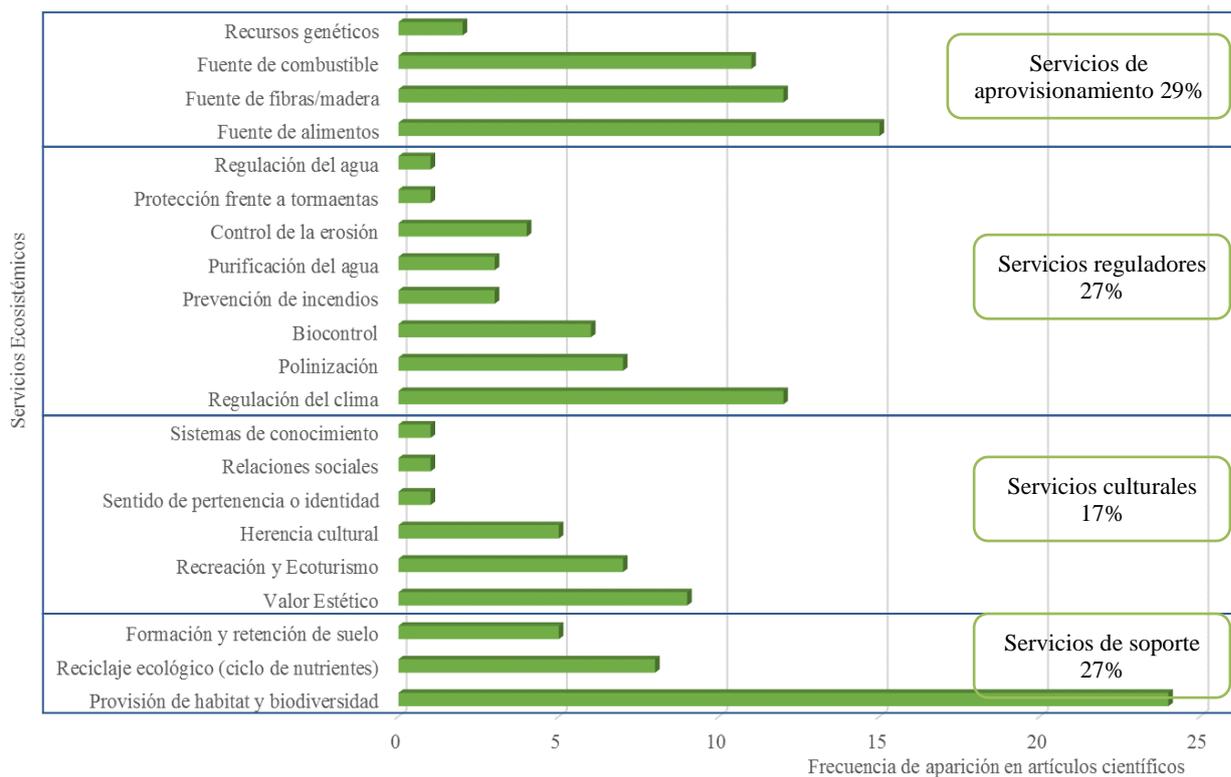


FIGURA 1.1 Principales servicios ecosistémicos asociados a los sistemas agroforestales y su frecuencia de aparición en 71 publicaciones relacionadas (Fagerholm *et al.*, 2016)

Por su parte, la TABLA 1.1 presenta algunos de estos servicios ecosistémicos asociados a los sistemas agroforestales, destacando los beneficios que suponen frente a los sistemas intensivos.

TABLA 1.1 Principales servicios ecosistémicos asociados a los sistemas agroforestales frente a sistemas intensivos

Categoría	Servicio	Fuente
Aprovisionamiento	- Incremento del aprovechamiento del agua dentro del sistema.	Van Noordwijk <i>et al.</i> (1996); Rowe <i>et al.</i> (2001).
	- Apoyo a la seguridad alimentaria	Kastner <i>et al.</i> (2012).
Reguladores	- Secuestro de carbono	Lorenz y Lal (2014).
	- Reducción de la erosión del suelo. - Disminución de la lixiviación de los nitratos gracias a la capacidad de los árboles de recuperarlos por debajo de la zona radicular de los cultivos.	Anderson y Sinclair (1993); Herzog (1997).
	- Facilitar la puesta en cultivo de tierras arables con suelos pobres y evitar la deforestación, por medio de los efectos mejorantes de los árboles.	Young (1997)
	- Biocontrol: reducción de malas hierbas, incremento de enemigos naturales y reducción de la abundancia de plagas en cultivos perennes	Pumariño <i>et al.</i> (2015)
Culturales	- Posibilidades de ocio, - Valor paisajístico y estético - Preservación del patrimonio cultural	Young (1997) ; McAdam <i>et al.</i> (2009) ; Smith <i>et al.</i> (2012) ; Tsonkova <i>et al.</i> (2012)
	- Conservación de la Biodiversidad	Matata <i>et al.</i> (2011)
	De soporte	

Fuente: Elaboración propia

1.1.2 El sistema Dehesa

Actualmente, los sistemas agroforestales se extienden en Europa por una superficie de, al menos, 15,4 millones de hectáreas, lo que supone un 3,6% del total del territorio y un 8,8% con respecto a las tierras de explotación agrícola (den Herder *et al.*, 2016).

Dentro de este grupo se incluyen paisajes tan diversos como los pastos arbolados, el uso de setos y cortavientos vivos o los bosques pastoreados, así como otros sistemas tradicionales entre los que destacan los huertos frutales de Centro Europa (*Streuobst*) o los bosques boreales del norte del continente (Plieninger *et al.*, 2015). Sin embargo, es en los países mediterráneos donde este tipo de sistemas encuentra mayor representación, estando ampliamente extendidos en el caso de España, como puede observarse en la FIGURA 1.2 (den Herder *et al.*, 2016).

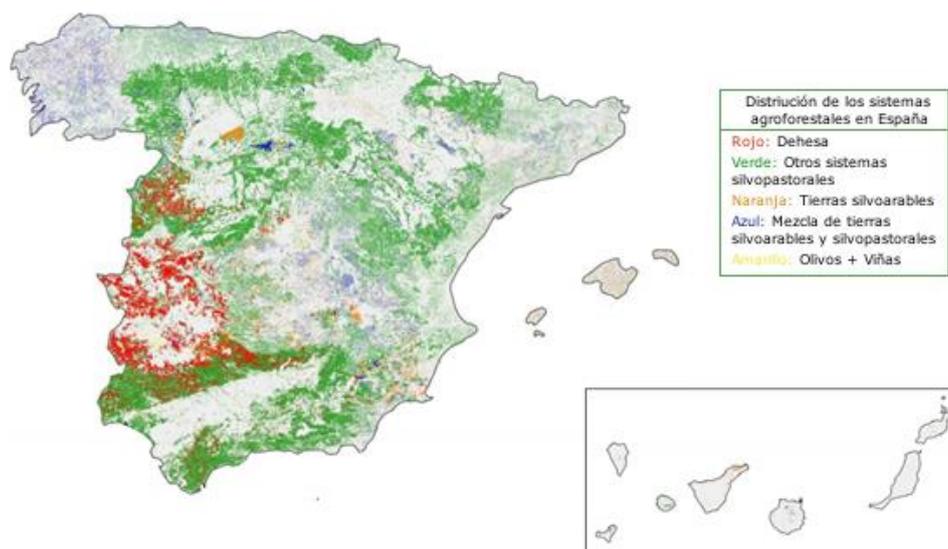


FIGURA 1.2 Distribución espacial de los sistemas agroforestales en España (den Herder *et al.*, 2016)

En concreto es la dehesa, situada en el suroeste de la Península Ibérica, uno de los sistemas agroforestales más extendidos de Europa, así como uno de los más representativos (Eichhorn *et al.*, 2006; Moreno y Pulido, 2008; Simón *et al.*, 2013). La dehesa se caracteriza así por combinar pastos o cultivos forrajeros con árboles, en su mayor parte del género *Quercus*, como *Quercus ilex* L. y *Quercus suber* L., generalmente dispersos (Gómez Gutiérrez y Pérez-Fernández, 1996).

Si bien es cierto que se considera que este es un sistema multipropósito (Linares, 2007; Moreno y Pulido, 2009), su producción suele estar orientada hacia su aprovechamiento por parte del ganado, lo que supone su principal fuente económica (Pliening y Wilbrand 2001; Asner *et al.*, 2004). Hay que tener en cuenta que el manejo que se hace de los animales en el marco de la dehesa, normalmente de razas autóctonas y mediante un pastoreo que implica bajas cargas ganaderas (Gaspar *et al.*, 2007), permite mejorar los rendimientos y aumentar la biodiversidad del estrato herbáceo (López-Sánchez *et al.*, 2016a).

La dehesa presenta por ello un alto valor medioambiental ligado a este equilibrio entre producción y conservación, que permite un uso sostenible de los recursos (Olea y San Miguel-Ayanz, 2006) así como por los importantes servicios ecosistémicos que presta

(Plieninger y Wilbrand, 2001; Díaz *et al.*, 2003; Gaspar *et al.*, 2016). Por otra parte, también resulta fundamental para entender la economía rural del suroeste peninsular, además de suponer un componente clave de la identidad regional (Escribano *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2004; Gaspar *et al.*, 2016).

Sin embargo, la productividad de estos sistemas suele ser reducida, influida por la severidad del clima y la baja calidad del suelo (Schnabel *et al.*, 2013). A esto hay que sumar la problemática actual que merma aún más tanto su productividad como su sostenibilidad y que incluye el cambio climático, el cambio de uso o el manejo inadecuado del suelo o la falta de regeneración del arbolado (Plieninger, 2007; Underwood *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2013; López-Sánchez *et al.*, 2016b).

La necesidad de atajar estos problemas, unido al alto valor ecológico y cultural, recogido incluso por la Unión Europea a través de la Directiva de Hábitats de 1992 (Díaz y Pulido, 2009), han hecho de la conservación y mejora de la dehesa un objetivo prioritario. En este sentido se torna necesario investigar e implementar todos aquellos aspectos que aumenten la rentabilidad de los sistemas tradicionales frente a su intensificación y que, por tanto, permitan el desarrollo de los servicios ecosistémicos asociados a este sistema agroforestal.

1.1.3 La mejora de la dehesa. El biocontrol

La Universidad de Extremadura posee ya un importante bagaje en lo referente al estudio de los sistemas agroforestales y silvopastorales de la región, especialmente asociado a la mejora de la dehesa (Olea *et al.*, 1990; Olea *et al.*, 2005; Pulido, 2010; Santamaría *et al.*, 2014). En concreto, buena parte de los esfuerzos han estado centrados en la búsqueda de nuevas técnicas de producción destinadas a favorecer el desarrollo sostenible de su sector agroganadero.

En este sentido destaca el interés por aumentar la biodiversidad beneficiosa que permita una menor dependencia de recursos externos. Es el caso de la mejora de los pastos naturales, a través del desarrollo de leguminosas (Santamaría *et al.*, 2014), o la introducción de especies forrajeras, tales como el triticale, mediante su adaptación a las condiciones propias de la región (Morales Rodrigo, 2011; Santamaría *et al.*, 2016).

También se han hecho avances en el fortalecimiento del estado de la planta, y en la mejora de su calidad nutritiva, tanto de pastos como de cultivos forrajeros, a través de la biofortificación agronómica (Poblaciones *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013) o del uso de hongos endófitos (Santamaría *et al.*, 2014; Lledó *et al.*, 2015; Lledó *et al.*, 2016). En el caso de estos últimos, además de su influencia directa sobre la calidad de la planta, cabe destacar su capacidad como elemento de **biocontrol**, estimulando la respuesta inmunitaria del hospedador frente a organismos patógenos (Santamaría *et al.*, 2012; Romeralo *et al.*, 2015).

En los últimos años, el uso de microorganismos para el control de enfermedades y patógenos en plantas ha crecido significativamente como alternativa a los compuestos químicos, ya que permite soslayar algunos de los problemas que estos presentan, como la aparición de resistencias, la contaminación del suelo o la pérdida de los microorganismos presentes en éste (Ludueña *et al.*, 2012). Además, de esta forma se consigue aunar el potencial de biocontrol con la mejora de la calidad que supone para la planta.

Estos microorganismos beneficiosos pueden ejercer su actividad inhibitoria de forma directa, mediante antibiosis, competición o parasitismo, o indirectamente, impulsando la propia respuesta de la planta frente al patógeno (Aneja *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2008). Por ello, es necesario estudiar el comportamiento de estos hongos (o bacterias en su caso) con el fin de conocer su respuesta frente a los patógenos objetivo y su interacción con la planta hospedante, para poder así maximizar su efectividad en el entorno elegido.

LOS HONGOS ENDÓFITOS

1.2 Los hongos endófitos

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos, capaces de producir esporas, hecho que les permite reproducirse rápidamente cuando las condiciones les son favorables. En cuanto a su desarrollo, la mayoría se caracteriza o bien por un crecimiento filamentoso, lo cual implica que sus células se desarrollan formando estructuras interconectadas conocidas como hifas, o por un crecimiento como levaduras unicelulares. Cabe destacar también el caso de los hongos dimórficos, que pueden alternar entre la fase filamentosa y la de levadura en función de las condiciones ambientales (Moretti y Sarocco, 2016; Daley *et al.*, 2017).

Dentro de la amplia biodiversidad que se asocia así al reino de los hongos, los endófitos suponen un grupo heterogéneo de especies capaces de crecer y colonizar asintóticamente el interior de las plantas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Estos hongos se suelen dividir, según su taxonomía, en dos grupos: clavicipitáceos y no clavicipitáceos (Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle 2005). A nivel funcional, la principal diferencia radica en el rango de especies que pueden infectar. De esta forma, mientras los primeros se desarrollan casi exclusivamente dentro de especies herbáceas, a las que colonizan sistemáticamente, el rango de hospedadores de los segundos es mucho más amplio, a pesar de que su desarrollo dentro de la planta puede estar más restringido (Sieber, 2007). En la TABLA 1.2 se muestran de forma más detallada las diferencias utilizadas para caracterizar ambos grupos. En el caso de los no clavicipitáceos, estos se subdividen en tres clases debido, principalmente, a su mayor diversidad frente a los clavicipitáceos.

TABLA 1.2 Criterios de división de los hongos endófitos

Criterio	Clavicipitáceos	No clavicipitáceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospedadores	Reducido	Amplio	Amplio	Amplio
Tejidos comúnmente colonizados	Brotos y rizomas	Brotos, raíces y rizomas	Brotos	Raíces
Colonización <i>in vivo</i>	Extensivo	Extensivo	Limitado	Extensivo
Biodiversidad <i>in vivo</i>	Baja	Baja	Alta	-
Transmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Beneficios adaptativos	Independientes del hábitat de origen	Independientes y dependientes del hábitat de origen	Independientes del hábitat de origen	Independientes del hábitat de origen

Fuente: Rodríguez *et al.*, 2009; Watkinson *et al.*, 2016a

En este sentido, y dado que comparten ciertas similitudes, conviene resaltar las diferencias de los hongos endófitos con respecto a los micorrícicos. Dichas diferencias se corresponden con tres características de estos últimos y de las que los endófitos carecen: la presencia de hifas especializadas, la sincronización del desarrollo planta-hongo y los beneficios directos que suponen para la planta con respecto a la transferencia de nutrientes (Brundrett, 2004).

Asimismo, aunque el término endófito incluye también a ciertas bacterias, suele encontrarse asociado principalmente a los hongos. Esto se debe a su mayor difusión y versatilidad, que les ha permitido colonizar una amplia variedad de plantas en todas las condiciones geoclimáticas (Patil *et al.*, 2016). Como consecuencia, todas las especies vegetales, incluyendo las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas, tienen potencial para establecer esta relación simbiótica con algún endófito (Rodríguez *et al.*, 2009). De hecho, estos hongos se han encontrado en todas las plantas examinadas hasta el momento y se calcula que pueden existir más de un millón de especies en la naturaleza (Guo *et al.*, 2008). Por ello, juegan un papel importante como componentes de los ecosistemas vegetales (Schardl *et al.*, 2004; Aly *et al.*, 2011) asociados al beneficio simbiótico que muchos de ellos suponen. En la relación que establece con la planta, el endófito obtiene nutrientes y protección de ésta, y a cambio, apoya el desarrollo de su hospedador y sintetiza ciertos metabolitos que favorecen la supervivencia de la planta (Verma *et al.*, 2009).

La asociación hongo-hospedante que se establece permite potenciar múltiples características de la planta. Se puede conseguir así impulsar el crecimiento y la producción de biomasa de la planta, asociado a su influencia sobre la fotosíntesis, o la mejora de su estado sanitario (Mei y Flinn, 2010; Baynes *et al.*, 2012). Además, existen endófitos altamente resistentes a la presencia de metales pesados, incluso con actividad quelante, lo que abre el camino para la remediación de suelos contaminados y regular la toxicidad que estos suponen para los cultivos (Khan y Lee, 2013).

De la misma forma, algunos hongos pueden conferir a la planta protección frente a enemigos naturales, como herbívoros, patógenos o enfermedades (Arnold *et al.*, 2003; Schardl *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2010) o frente a estreses abióticos como la salinidad (Khan *et al.*, 2014) la temperatura (Rodríguez *et al.*, 2004; Márquez y Redman, 2007; Hubbard *et al.*, 2014) o la sequía (Rodríguez *et al.*, 2004; Peñuelas *et al.*, 2012; Hubbard *et al.*, 2014). Es importante reseñar que también pueden servir para controlar los niveles de micotoxinas tanto en campo como en postcosecha, contribuyendo incluso a la descontaminación y purificación de los alimentos (Moretti y Sarocco, 2016). Todo esto puede suponer una mayor competitividad frente al resto de plantas presentes en su entorno (Aschehoug *et al.*, 2012).

En cuanto a su localización, los hongos endófitos pueden desarrollarse prácticamente en cualquier tejido de la planta, lo que incluye a las raíces, el tallo, las hojas, los frutos o las

semillas (Stone *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2009). Por otra parte, tanto su ciclo biológico como su efecto sobre el hospedador se encuentra profundamente influido por diferentes factores que no tienen por qué ir ligados exclusivamente a la planta (como el estado fisiológico de ésta), sino que pueden ser de carácter externo, como en el caso de las condiciones ambientales (FIGURA 1.3).

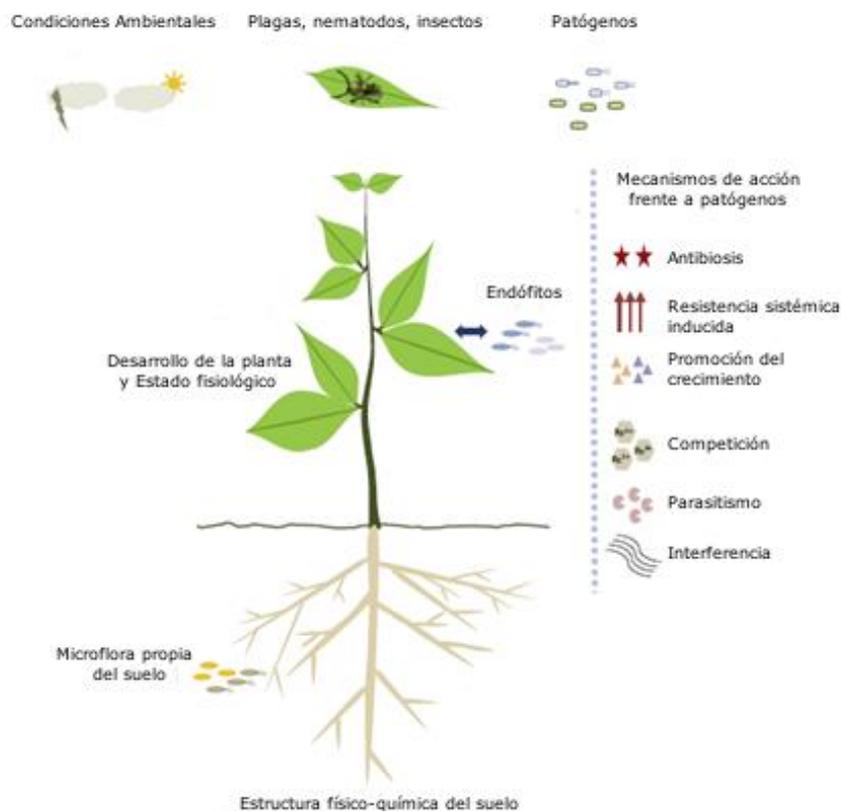


FIGURA 1.3 Factores que afectan a los endófitos (Adaptado de Eljounaidi *et al.*, 2016)

El tipo de interacción que se establece entre el endófito y la planta está, por tanto, controlado esencialmente por los genes de ambos y modulado por el ambiente (Moricca y Ragazzi, 2008). Como consecuencia, un endófito puede residir dentro de su hospedador asintóticamente o siendo beneficioso para éste y que su actividad se torne patogénica como respuesta a algún tipo de cambio en el entorno (Hendry *et al.*, 2002). Así, por ejemplo, estos hongos tienden a reproducirse justo o durante la senescencia de la planta (Squire, 1981), momento en que su actividad puede tornarse patogénica para la misma (Rodríguez *et al.*, 2009). De este modo se considera que su principal papel dentro del ecosistema es el de descomponedores, encontrándose entre los primeros colonizadores de los tejidos vegetales muertos (Kumaresan y Suryanarayanan, 2002; Hyde y Soyong, 2008; Oses *et al.*, 2008).

Por ello, resulta fundamental conocer la respuesta de los endófitos frente al ambiente antes de que puedan ser usados directamente para tratar plantas o semillas. Con esta acción se conseguiría el efecto del hongo como barrera protectora desde dentro del propio tejido vegetal (Backman y Sikora, 2008) limitando posibles efectos secundarios negativos que el mismo podría provocar.

Como ya se ha comentado con anterioridad, esta capacidad protectora podría hacer de los hongos endófitos una alternativa atractiva para la industria biotecnológica. Podrían conseguirse organismos con actividad antibiótica específica frente a patógenos, insectos o nematodos que sustituyeran a los fitosanitarios de origen químico, y cuya eficacia persistiera durante todo el ciclo productivo. Sin embargo, hay que tener en cuenta la variabilidad que introduce el ambiente, que puede modificar significativamente el efecto del hongo sobre la planta. Por tanto, una opción interesante sería utilizar directamente los metabolitos secundarios bioactivos producidos por los hongos, que permitirían minimizar dicha variabilidad.

1.3 Los metabolitos secundarios

Generalmente, el efecto beneficioso que el hongo ejerce sobre la planta es consecuencia de la acción de los metabolitos secundarios que éste sintetiza o de los derivados semisintéticos de estos (Yu *et al.*, 2010). Estos metabolitos suponen una fuente importante de compuestos activos para muchos microorganismos, especialmente hongos y bacterias (Leitao y Enguita, 2014).

El término metabolito hace referencia a cualquier compuesto producido por un organismo, bien para su crecimiento y desarrollo (metabolito primario) bien como parte de sus mecanismos de defensa y supervivencia (metabolito secundario), siendo estos últimos sintetizados a partir de los primeros (Al-Fakih, 2014). En concreto, el grupo de los metabolitos secundarios está constituido por una amplia variedad de productos naturales con una gran diversidad estructural y funcional, en el que prácticamente todos tienen importancia a nivel biológico y comercial (Khan *et al.*, 2014).

Hay que tener en cuenta que las vías metabólicas de estos metabolitos secundarios tienden a ser ramificadas y a interaccionar unas con otras. Una enzima puede catalizar

reacciones con múltiples productos, y estos productos a su vez servir de sustratos para nuevas reacciones, lo cual explicaría la amplia variedad de metabolitos encontrada (Watkinson, 2016b). Uno de los ejemplos más conocidos de estos compuestos comercializados son los antibióticos, como las cefalosporinas o la penicilina (FIGURA 1.4), ambas de origen fúngico.

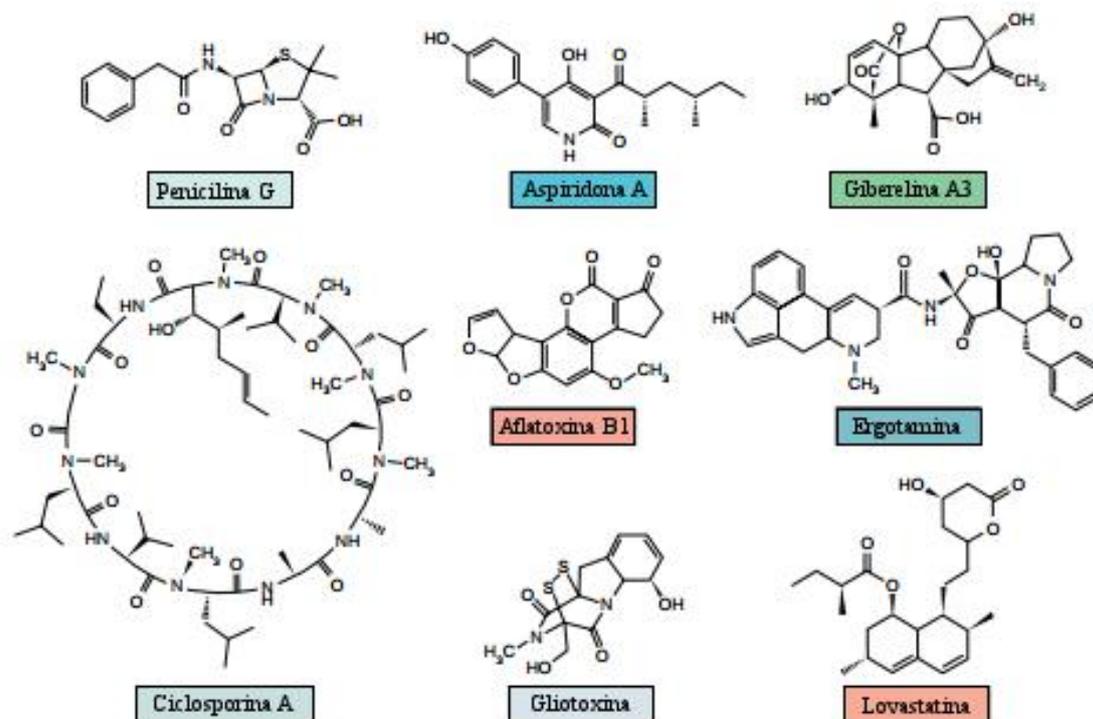


FIGURA 1.4 Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por hongos (Brakhage, 2013)

El descubrimiento de la penicilina por sir Alexander Fleming (1928) que observó cómo una cepa de hongos del género *Penicillium* inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, supuso un avance crucial para la medicina (Wainwright, 2008; Khan *et al*, 2014). Sin embargo, la creciente aparición de resistencias hace necesario continuar buscando nuevos compuestos bioactivos, siendo los hongos, como ya se ha dicho, una fuente importante de éstos.

En el caso de los hongos endófitos, es la compleja interacción que establecen con la planta la que estimula que produzcan un gran abanico de estos metabolitos secundarios (Hyde, 2005; Suryanarayanan *et al.*, 2009).

Además, esta fuerte relación hongo-planta lleva a que estos metabolitos presenten algún tipo de actividad a menores concentraciones que los compuestos de síntesis homólogos, lo que los hace aún más atractivos para su aplicación biotecnológica (Duke *et al.*, 2000a).

Muchos de ellos presentan una fuerte actividad biológica, asociada, entre otros efectos, a su capacidad antioxidante, antibiótica, anticancerígena o inmunosupresora (Duke *et al.*, 2000a; b; Gutiérrez *et al.*, 2012; Challinor y Bode, 2015; Koul *et al.*, 2016).

Las distintas vías de los metabolitos secundarios se expresan como respuesta a señales ambientales. Estos estímulos influyen en la síntesis de proteínas que regulan la expresión de los distintos grupos de genes que afectan a los metabolitos (FIGURA 1.5). Por ello, el cultivo *in vitro* puede considerarse una opción para disminuir esta variabilidad ambiental, permitiendo describir las distintas rutas metabólicas. Una vez conocidas, se pueden ajustar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de los compuestos buscados.

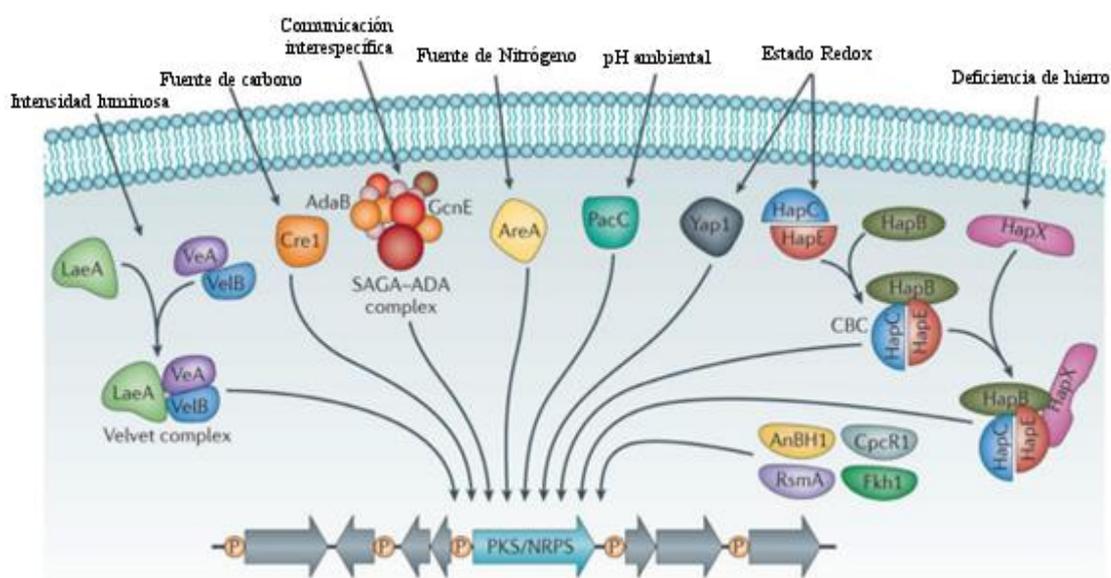


FIGURA 1.5 Ejemplo de regulación de la producción de metabolitos secundarios en función de factores ambientales (Brackhage, 2013; Watkinson, 2016b)

Se cuenta con la ventaja de que el medio de cultivo para los hongos es relativamente simple y económico, al consistir en muchas ocasiones en subproductos industriales, y presenta un período de fermentación más corto que los cultivos de tejidos o células vegetales (Venugopalan y Srivastava, 2015). De este modo, la fermentación industrial podría ser usada para obtener compuestos naturales activos a gran escala, con costes reducidos y menores emisiones (Wang *et al.*, 2015).

El procedimiento general de obtención de estos compuestos se muestra en la FIGURA 1.5. Este proceso parte de la propia planta, cuya elección puede hacerse en función de factores como su buena adaptación a su entorno, o su importancia medicinal. Seleccionada la planta, se deben esterilizar superficialmente muestras de la misma, con el fin de favorecer el crecimiento de los hongos presentes y proceder a su aislamiento. Una vez obtenidos cultivos axénicos de estos, su identificación se lleva a cabo atendiendo a su morfología y a técnicas moleculares. El siguiente paso consiste en su cultivo *in vitro*, el cual puede realizarse en medio sólido o en medio líquido. La extracción de los metabolitos se realiza a partir de los cultivos anteriores, y es este extracto crudo el que se somete a la evaluación de su bioactividad, principalmente su capacidad antioxidante y antimicrobiana. Por último, en el caso de que se obtuvieran resultados positivos, puede procederse a la caracterización de los metabolitos responsables, utilizando técnicas espectroscópicas o cromatográficas (Arora *et al.*, 2016; Gasong y Tjandrawinata, 2016; Patil *et al.*, 2016).

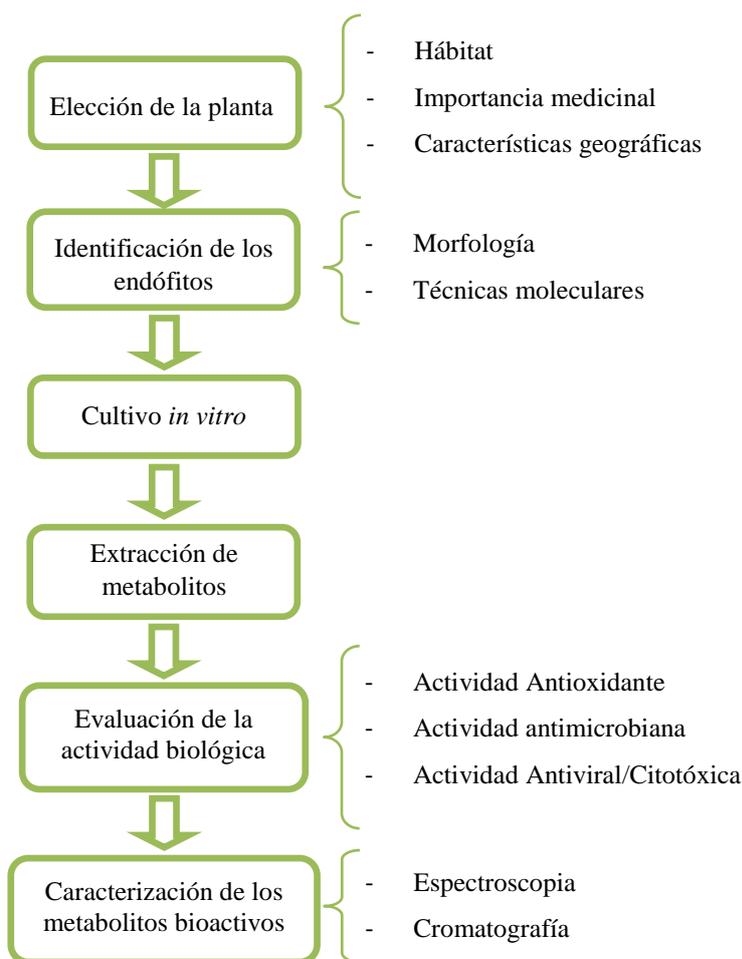


FIGURA 1.6 Resumen esquemático de la obtención de metabolitos bioactivos a partir de microorganismos endófitos (Patil *et al.*, 2016).

Algunos de los compuestos biológicamente activos que producen estos endófitos son similares, o incluso idénticos a los producidos por la planta hospedante (Kusari *et al.*, 2012, Michalczyk *et al.*, 2014; Palem *et al.*, 2015). Es el caso del taxol (Stierle *et al.*, 1993), la capsaicina (Devari *et al.*, 2014) o la piperina (Chithra *et al.*, 2014). Así, la fermentación *in vitro* de endófitos capaces de sintetizar metabolitos análogos a los de las plantas puede ser una solución para reducir la sobreexplotación de éstas. Se aseguraría un suministro constante de metabolitos secundarios de la planta, que además sería independiente de las condiciones ambientales (Venugopalan y Srivastava, 2015).

De la misma forma, también pueden producir metabolitos secundarios nuevos (Schulz *et al.*, 2002), lo que incluye a veces estructuras químicas únicas de gran importancia (Liu *et al.*, 2002).

Como consecuencia de lo anterior, estos metabolitos secundarios resultan de interés para su aplicación en campos tan diversos como la industria médico-farmacéutica, la biotecnológica o la agronómica (Nisa *et al.*, 2015; Daley *et al.*, 2017).

De entre las aplicaciones en el campo de la medicina, el mejor ejemplo es el taxol. Producido por el hongo *Taxomyces andreana*, este compuesto es utilizado principalmente por su eficacia en tratamientos contra el cáncer (Strobel *et al.*, 2004). Pero no es el único, existen otros endófitos con actividad anticancerígena como *Colletotrichum gloeosporioides* (Gasong y Tjandrawinata, 2016) y *Xilaria psidii* (Arora *et al.*, 2016). Por otra parte, destaca también la ciclosporina A, extraída de *Trichoderma polysporum*, que fue utilizada en principio como elemento antifúngico, si bien ahora su utilidad radica en su alta actividad como inmunosupresor, usándose para prevenir rechazos en operaciones de trasplante de órganos (Chappell y Wastling, 1992; Keller *et al.*, 2005).

A nivel biotecnológico, destaca la capacidad de ciertos hongos endófitos de producir aceites esenciales de sus hospedantes como parte de su metaboloma. La producción de compuestos como el limoneno (Shaw *et al.*, 2015) o el zingibereno (Santos Filho *et al.*, 2011) expresa su potencial para ser usados como agentes saborizantes en la industria alimentaria (Abrahão *et al.*, 2013) o como biocombustibles (Bohlmann, y Keeling, 2008).

En cuanto a los aspectos agronómicos, en general, los endófitos juegan un importante papel en la fisiología de sus hospedadores a través de sus metabolitos, al influir en la resistencia frente a enfermedades y el estrés (Naik *et al.*, 2009). También pueden acelerar el crecimiento de la planta y potenciar la capacidad de fijación de nitrógeno (Zhao *et al.*, 2014).

Así se encuentran compuestos como el β -caroteno, extraído industrialmente del hongo *Blakeslea trispora*, presente en plantas como las zanahorias, que sirve para favorecer los procesos de la fotosíntesis y como fotoprotector (De Baets *et al.*, 2000).

Por otra parte, se han observado endófitos capaces de producir sustancias reguladoras del crecimiento, como por ejemplo, las giberelinas obtenidas a partir de *Gibberella fujikuroi*, y usadas para incrementar el rendimiento de las producciones, controlar la floración, la germinación de semillas o la elongación del tallo (Tashjian y Armstrong, 2012). Otras hormonas sintetizadas son el estrógeno zearalenona, producido por *Gibberella zeae* y usado para incrementar el crecimiento y la eficiencia de la alimentación en rumiantes (Demain y Fang, 2000; Adrio y Demain, 2003) o el ácido indolacético, aislado de *Paecilomyces formosus* (Khan *et al.*, 2012).

En la lucha contra plagas y enfermedades, se han encontrado endófitos, como *Neotyphodium lolii*, capaz de producir alcaloides con propiedades insecticidas (Thom *et al.*, 2013), mientras que otros, como *Trichoderma asperellum*, pueden potenciar en la planta la presencia de diversos compuestos, como la peroxidasa, con propiedades germicidas y bactericidas (Segarra *et al.*, 2007).

1.4 Bioactividad. Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana

Sin embargo, el objetivo del presente TFM gira en torno a la bioactividad de los hongos endófitos. A medio camino entre la aplicación agronómica y la médica, la evaluación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios, especialmente la actividad antioxidante y la microbiana, puede suponer una mejora sustancial para el estado de la planta y su desarrollo.

La actividad antimicrobiana que puedan presentar los hongos endófitos a través de los metabolitos que producen es un factor fundamental a conocer, ya que influye de manera

notoria sobre el crecimiento y desarrollo de su planta hospedante (Santamaría *et al.*, 2012). En este sentido, se han aislado ya diversos compuestos que presentan actividad antibacteriana, contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y micobacterias (Zhao *et al.*, 2012). Como ejemplo, los compuestos producidos por *Phoma terrestres* o *Penicillium spp.*, que tienen la capacidad de inhibir la germinación de esporas y el crecimiento de patógenos, lo que resalta su capacidad para ser usado como agente de biocontrol (Park *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017)

Por su parte, la actividad antioxidante favorece la protección de las plantas frente a diversos estreses bióticos y abióticos (Baltruschat *et al.*, 2008), favoreciendo el crecimiento de la planta. Diversos estudios han constatado ya la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios de origen fúngico (Yadav *et al.*, 2014; Prihantini y Tachibana, 2016). Así, *Cephalosporium sp.*, endófito aislado de *Trachelospermum jasminoides* produce grafislactona A, un compuesto fenólico con una fuerte actividad antioxidante (Song *et al.*, 2005), mientras que *Pestalotiopsis microspora* sintetiza dos metabolitos con capacidad antioxidante, como el pestacin y el isopesacin (Harper *et al.*, 2003).

Todo esto no hace sino poner de manifiesto el enorme potencial de los hongos endófitos para el impulso de los sistemas agroforestales, ya que podría reducir el consumo de agroquímicos de síntesis. Además, esta utilización se puede encarar desde dos perspectivas: utilizando directamente el organismo fúngico, o mediante el uso de los metabolitos secundarios bioactivos que eventualmente pudieran producir.

Sin embargo, como se ha indicado en apartados anteriores, la utilización directa del organismo vivo presenta algunos inconvenientes, como la dependencia de las condiciones ambientales y las interrelaciones con la planta hospedante y con otros organismos del sistema (Ahlholm *et al.*, 2002), lo que puede llevar a una falta de consistencia en los resultados. Por tanto, en aquellos casos en los que el efecto causado por el endófito no dependa de la interrelación de organismos vivos, el estudio de los metabolitos secundarios toma especial relevancia, ya que se podrían conseguir efectos más consistentes y productos de mayor facilidad en el manejo y utilización.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo del presente Trabajo Fin de Máster fue el de evaluar la actividad biológica de hongos endófitos obtenidos en el ámbito de la dehesa. Dicha evaluación se realizó mediante la obtención y el estudio del extracto crudo de dos endófitos, los cuales habían sido testados previamente *in vivo*, y habían mostrado potencial para la protección frente a plagas y enfermedades en las plantas.

Para ello, fue necesario evaluar la capacidad de los extractos crudos de dichos hongos como responsables de la actividad antimicrobiana y antioxidante. Los objetivos específicos que se marcaron fueron, por tanto, los siguientes:

1. Obtención de los extractos crudos de las fracciones líquidas tras el fermentado de los hongos
2. Comprobación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos crudos de los hongos
3. Comprobación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos crudos de los hongos

Adicionalmente se comenzó la identificación de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana gracias a técnicas cromatográficas.

CAPÍTULO III
MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de los hongos endófitos.

Para la elaboración del presente TFM, se eligieron los hongos endófitos *Embellisia leptinellae* (en adelante 138) y un hongo no identificado aún, también del orden de los Pleosporales (en adelante 234), ambos pertenecientes a la colección de hongos que posee el Grupo de Investigación de Agronomía de la Universidad de Extremadura. Dichos hongos fueron aislados de plantas sanas procedentes de diferentes dehesas extremeñas. En concreto, el hongo 138 se aisló del tallo de *Ornithopus compressus* L., mientras que el 234 se obtuvo a partir de las hojas de *Biserrula pelecinus* L., ambas de una dehesa de Malpartida de Plasencia

La selección de ambos hongos se hizo en base a los resultados previos del grupo que estos endófitos mostraron cuando fueron enfrentados a hongos patógenos *in vitro* e *in vivo*, así como a la ausencia de síntomas de patogeneicidad en planta cuando se inocularon en solitario en plantas vivas. La información taxonómica conocida de ambos hongos se presenta en la TABLA 3.1.

TABLA 3.1 Clasificación taxonómica de los hongos en estudio

Taxonomía	Hongo 138	Hongo 234
Reino	Fungi	
Filo	Ascomycota	
Subdivisión	Pezizomycotina	
Clase	Dothideomycetes	
Orden	Pleosporales	
Familia	Pleosporaceae	-
Género	<i>Embellisia</i>	-
Especie	<i>Embellisia leptinellae</i>	-

Fuente: Simmons, 1990; Mycobank, 2017

3.2 Cultivo y obtención del filtrado.

Una vez seleccionados los hongos, el primer paso fue la preparación de una cantidad suficiente de caldo de cultivo de los mismos con la que poder llevar a cabo la obtención del extracto crudo del hongo y posteriormente los distintos análisis propuestos.

Para ello se partió de muestras de ambos hongos, obtenidas de placas Petri conservadas a 4°C. Estas muestras sirvieron de inóculo usando cinco trozos circulares (5 mm de diámetro) por cada 250 mL de medio líquido autoclavado de extracto de malta y levadura (YM), preparado con 10 g de extracto de malta, 4 g de D-glucosa, 4 g de extracto de levadura y 1 L de agua destilada ajustando el pH a 6.3.

El crecimiento de los hongos se produjo bajo unas condiciones de 23°C de temperatura y una agitación a 140 rpm, tal como se reseña en la TABLA 3.2 y según las indicaciones proporcionadas por Stadler *et al.* (2001). Con el fin de monitorizar su crecimiento, se controló diariamente la concentración de glucosa del medio, considerándose finalizado el desarrollo del micelio en el momento en que dicha concentración llegó a 0.

TABLA 3.2 Condiciones establecidas para el crecimiento de los endófitos

Parámetro	Condiciones
Temperatura	23°C
Agitación	140 rpm
pH del Medio	6,3

Una vez consumida la glucosa, se mantuvo todavía el hongo durante 48 h más en el caldo de cultivo antes de ser filtrado. Esta decisión se debe al hecho de que la producción de metabolitos suele darse una vez finaliza el crecimiento activo del hongo (Dewick, 2009). Dicha producción se asocia también a situaciones de estrés como puede ser la ausencia de alimentos, en este caso, principalmente la glucosa. Así, se considera éste (48 h) un tiempo suficiente para que el hongo produzca dichos metabolitos sin que se deteriore el propio hongo ni que consuma los propios metabolitos. Se limita así la posibilidad de que se produzca un crecimiento micelial descontrolado que puede afectar negativamente a la producción de metabolitos (Patil *et al.*, 2016).

Completada la fase de crecimiento, se procedió al filtrado del medio, separando la fase líquida del micelio. Para los diferentes ensayos se decidió continuar con el sobrenadante (fase líquida filtrada), debido a que, presentando metabolitos al igual que la fase sólida, su manejo suele ser más uniforme además de que permite disminuir la cantidad de ácidos grasos que causen interferencias en los posteriores resultados.

3.3 Obtención del extracto crudo

Con el objetivo de maximizar el contenido de metabolitos secundarios con resultados positivos, se obtuvieron los extractos crudos a partir de los filtrados, para lo que se siguió la metodología descrita por Halecker *et al.* (2014).

En primer lugar, el filtrado producido por cada hongo se mezcló, por agitación durante aproximadamente 1 minuto, con un volumen idéntico de etil acetato (1:1). Posteriormente, la fase acuosa se eliminó mediante el uso de un embudo de decantación, mientras que la fase orgánica restante fue evaporada en el rotavapor. Las condiciones que se mantuvieron durante esta fase de evaporación fueron de 250 mbar de presión, 40°C de temperatura y 120 rpm.

El extracto resultante se diluyó en 2,5 mL de metanol y se transfirió a un vial previamente pesado para poder conocer, por diferencia, la cantidad total obtenida de extracto.

Por último, el contenido de dicho vial se evaporó en un concentrador de nitrógeno, obteniéndose el extracto crudo a evaluar.

3.4 Evaluación de la actividad antioxidante.

La medición de la actividad antioxidante se realizó en función de la capacidad del extracto crudo para la captura de radicales libres DPPH, adaptando el método propuesto por Braca *et al.* (2001). De esta forma, se preparó una disolución base de DPPH en metanol al 0,004%. Por otra parte, los extractos crudos se disolvieron, también en metanol, hasta conseguir una concentración de 5 mg mL⁻¹. Partiendo de esta última solución, se realizaron una serie de diluciones sucesivas hasta conseguir distintas concentraciones de cada hongo 1,2; 0,6; 0,3; 0,15; 0,075 y 0,0375 mg mL⁻¹.

Al desconocer la capacidad antioxidante de los hongos, estas concentraciones se tomaron teniendo en cuenta la bibliografía existente (Saha *et al.*, 2008; Rahiman *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Posteriormente, se incluyeron correcciones en función de la actividad antioxidante exhibida por las muestras.

Las muestras así obtenidas se mezclaron en una proporción 1:1 con la solución de DPPH 0,004% hasta alcanzar un volumen de 3 ml. Asimismo, se utilizó ácido ascórbico como patrón de referencia, para lo que se realizó una curva de calibrado a distintas concentraciones (100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5 y 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), que sirvió tanto para comparar los resultados obtenidos como para verificar la validez del método utilizado.

Todas las mezclas fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos a 25°C, midiéndose a continuación su absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro (Unicam Helios Alfa). La propia solución de DPPH al 0,004% fue utilizada como muestra control y blanco. La capacidad de captura de radicales libres de cada muestra se calculó según la fórmula aportada por el método (FÓRMULA 3.1).

$$\% \text{ Captura de Radiales} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \quad (3.1)$$

Con los datos de actividad antioxidante obtenidos de la fórmula anterior, se elaboró una curva de inhibición, relacionando concentración y porcentaje de captura de radicales, a partir de la cual se pudo calcular el valor de IC₅₀ correspondiente a cada hongo, así como al ácido ascórbico.

3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó midiendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ambos extractos crudos frente al crecimiento de 2 organismos patógenos, cuyas cepas se obtuvieron a través de la Colección Española de Cultivos Tipo. Las especies seleccionadas fueron *Bacillus subtilis* (NCTC 8236), bacteria tipo Gram + muy utilizada en este tipo de tests, y *Botrytis cinérea* (CECT 20518) patógeno fúngico habitual en campos y cosechas hortícolas.

Por ello, como fase previa al test, fue necesario preparar cultivos de ambos patógenos, utilizando medio EBS (realizado con 5 g de peptona caseína, 5g de glucosa, 1g de extracto de levadura, 1g de extracto de carne, 11,9 g de Hepes y 1 L de agua destilada, ajustando el pH a 7,5) para la bacteria y medio YM (previamente descrito) para el hongo. El proceso y las condiciones de crecimiento de *B. cinerea* fueron las mismas que en el caso de los hongos 138 y 234, mientras que la bacteria creció a 30°C.

Para la realización del test se utilizaron placas multipocillo o *microtiter*, de 96 pocillos, siguiendo el procedimiento descrito por Halecker *et al.* (2014).

En primer lugar, se añadieron a cada pocillo 130 μ L de una solución del **patógeno a evaluar**, a una concentración de $6,7 \times 10^5$ células ml^{-1} . Para obtener dicha concentración, se partió de los cultivos de cada patógeno, preparados con antelación. Se realizó un recuento en microscopio, de células o esporas según el caso, mediante una cámara de Neubauer, lo que permitió averiguar la concentración del cultivo. Conocida dicha concentración, se calculó la cantidad de cultivo necesaria a añadir en 20 mL de medio (EBS para bacteria, YM para hongo) para obtener la concentración buscada ($6,7 \times 10^5$ células ml^{-1}).

Para el siguiente paso, se procedió a la preparación de los **hongos 138 y 234**, a partir de los extractos crudos evaporados. Se calculó, sustrayendo el peso de los viales, el peso total de los metabolitos extraídos de cada muestra, siendo estas resuspendidas en metanol hasta alcanzar la concentración de $4,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Posteriormente, se añadieron 20 μ L del extracto crudo, a $4,5 \text{ mg mL}^{-1}$, de cada hongo en la primera fila de la placa (Figura 3.1).

De la misma forma, para corroborar que los resultados obtenidos fuesen válidos, se introdujo un **control negativo**, usando el mismo compuesto líquido que se utilizó para resuspender los hongos (en este caso, metanol); así como también un **control positivo**, usando penicilina en el caso de *Bacillus subtilis* y ciclohexamida en el caso de *Botrytis cinerea*, ambas a una concentración de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Como en el caso de los hongos, esto supuso la adición de 20 μ L de ambos compuestos en la primera fila de la placa de 96 pocillos.

Tanto para los extractos crudos como para los controles positivo y negativo, se realizaron 3 repeticiones por placa, con el fin de mejorar la fiabilidad de los resultados (FIGURA 3.1).

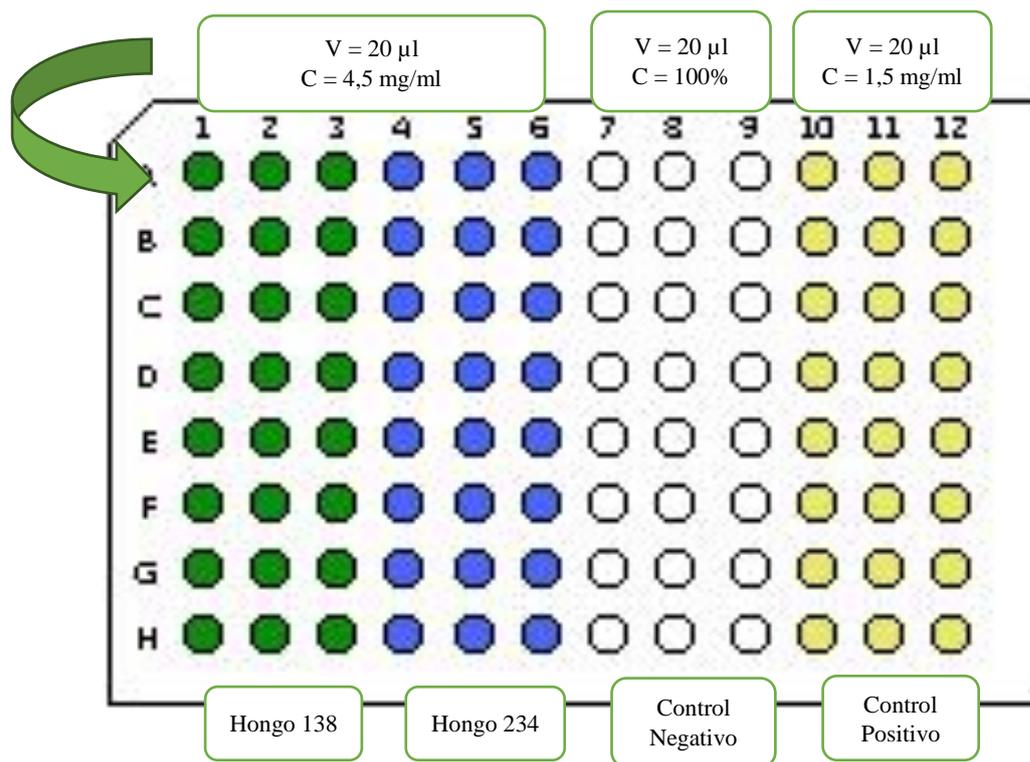


FIGURA 3.1 Esquema de las placas utilizadas para la determinación de la CMI

Finalmente, la evaluación de la *Concentración Mínima Inhibitoria* se determinó aplicando una dilución en serie para cada fila hasta alcanzar una concentración del 50% de extracto crudo con respecto a la fila superior.

La bioactividad frente a los organismos objetivo se comprobó tras un período de 24 horas en el caso de la actividad frente a bacterias y pasadas 48 h para las placas en las que se comprobó la inhibición de hongos patógenos. Durante el período de incubación, estas placas se mantuvieron en condiciones de 30°C y 600 rpm.

3.6 Ensayo de bioactividad dirigida del extracto crudo para la identificación de los metabolitos causantes del efecto antimicrobiano.

Como paso adicional, se obtuvo el semi-fraccionado de los extractos crudos con el fin de determinar los metabolitos con actividad antibiótica, según el método descrito por Halecker *et al.* (2014). Para ello, se partió de la solución del extracto crudo usada para evaluar la actividad antioxidante, a una concentración de 5 mg mL⁻¹. De dicha muestra se inyectaron 20 µL en un HPLC de fase reversa con colector acoplado a un detector de masas y un detector de longitud de onda DAD (*Scan DAD 200-600nm, con intervalo de 2nm.*), utilizando como

solventes esencialmente agua MilliQ y acetonitrilo. El fraccionamiento de la muestra se obtuvo aplicando un caudal de separación y un gradiente de solventes agua/acetonitrilo con las condiciones que se muestran en la TABLA 3.3.

TABLA 3.3 Parámetros del HPLC utilizados para el semi-fraccionamiento de los extractos crudos

Parámetro	Configuración
Solvente A	Acetonitrilo/Agua (5%/95%) + 5 mmol de Acetato de Amonio + 40 $\mu\text{l L}^{-1}$ de ácido acético
Solvente B	Acetonitrilo/Agua (95%/5%) + 5 mmol de Acetato de Amonio + 40 $\mu\text{L l}^{-1}$ de ácido acético
Caudal	0,3 mL min^{-1} pocillo ⁻¹ (30 s pocillo ⁻¹)
Gradiente	$t_0 = 10\%$ solvente B, $t_{30} = 100\%$ solvente B, $t_{40} = 100\%$ solvente B (isocrático)
Detección ultravioleta	210 nm, 350 nm, 360 nm
Columna	Zorbax Eclipse Plus C18 3,5 μm 4,6X100mm

Al realizar un fraccionamiento por tiempo, a la vez que se obtuvo un cromatograma de la muestra procesada por el HPLC, esta fue recogida por el colector en una placa *microtiter* de 96 pocillos. De esta forma, con las condiciones dadas, se depositaron 150 μL por pocillo. Una vez finalizado, la placa se secó en un evaporador de nitrógeno, y rellena con 150 μL por pocillo de una solución del organismo objetivo y medio de cultivo a una concentración de $6,7 \times 10^5$ células mL^{-1} . En este caso solo se utilizó *Bacillus subtilis* como patógeno de referencia. Tras 20 horas (para el caso de bacterias, 48 horas si se hubiera tratado de un hongo se observó qué fracción fue la que contuvo el metabolito causante del efecto antibiótico. De esta forma, los pocillos que mostraron inhibición del crecimiento del patógeno permitieron conocer el tiempo de retención del compuesto responsable de dicha actividad.

3.7 Identificación química de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana

Con el objetivo de completar la identificación de las moléculas con actividad antimicrobiana, el ensayo de bioactividad dirigida anterior se llevó a cabo con un detector DAD acoplado al HPLC. Este hecho permitió obtener, junto con los tiempos de retención de los compuestos bioactivos, el cromatograma del espectro ultravioleta (UV) de cada extracto. Asimismo, para poder proseguir con la identificación de los metabolitos fue necesario obtener, además, los cromatogramas de masas positivo y negativo de los extractos crudos. Para ello, ambas muestras tuvieron que ser analizadas de nuevo en el HPLC, empleando en este caso el detector de masas, pero manteniendo las condiciones previas mostradas en la TABLA 3.3.

De esta forma, la posible identificación de las moléculas responsables de la actividad antimicrobiana comenzó cruzando los tiempos de retención con los cromatogramas obtenidos. Cada pocillo que mostró actividad antimicrobiana llevaba asociado un intervalo de tiempo de medio minuto (TABLA 3.3), período que fue utilizado para acotar y comprobar que existiera en el citado tiempo de retención un pico de actividad que fuera prácticamente coincidente en el tiempo en los tres cromatogramas (cromatograma DAD, cromatograma masa positiva y cromatograma masa negativa). En los casos en que se esto fue así, se procedió a estudiar el cromatograma del DAD, puntoso en toda su extensión de la muestra, sino para el pico surgido en el tiempo de retención indicado. Posteriormente se cotejaron los cromatogramas de masas correspondientes a dicho punto (pico en el tiempo de retención) del DAD, para así conocer de forma aproximada la masa de la molécula bioactiva.

Con el fin de ajustar aún más la masa de dicha molécula, y por tanto mejorar las probabilidades de identificarla correctamente, la muestra se analizó por tercera vez en un HPLC-QTOF (Sistema LC 1260 Infinity acoplado a 6520Accurate Mass Q-TOF LC/MS de Agilent Technologies), manteniendo de nuevo las condiciones mostradas en la TABLA 3.3, ya que el detector de masas del primer HPLC no arrojaba la masa con más allá de un solo decimal. En este caso, conociendo ya aproximadamente tanto el tiempo de retención como la masa, se comprobó que existiera una masa similar en dicho tiempo, considerando este un peso más exacto, que permitió conjeturar sobre la fórmula química de la molécula.

Esto podría permitir su identificación aproximada gracias a las bases de datos de compuestos químicos, en el caso de que fuese un compuesto conocido. En todo caso, los resultados habría que confirmarlos llevando la muestra a un MS/MS para obtener la masa exacta y aun HPLC fraccionador, para aislar la molécula activa antes de realizar un análisis con Resonancia Magnética Nuclear y caracterizar el compuesto desconocido.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Condiciones de cultivo. Rendimiento

Como puede observarse en la TABLA 4.1, las condiciones que se establecieron para el crecimiento de los hongos elegidos fueron idénticas en ambos casos. Se realizó así con el fin de establecer una base homogénea y no introducir variables que impidieran comparar los resultados. Este hecho es de especial importancia teniendo en cuenta la fuerte repercusión que estas condiciones pueden tener tanto sobre la producción del hongo como en sus propiedades (Bode *et al.*, 2002; Patil *et al.*, 2016).

TABLA 4.1 Condiciones y resultados del crecimiento de los hongos endófitos

	Parámetro	Hongo 138	Hongo 234
Condiciones de crecimiento	Medio de cultivo	Yeast-Malt (YM)	
	Temperatura	23°C	
	Agitación	140 rpm	
	pH del Medio	6,3	
	Volumen de medio de cultivo	250 mL	
Rendimiento	Tiempo de cultivo ($t_{[Glucosa]=0} + 2$ días)	7 días	8 días
	Peso final extracto crudo	18 mg	21,2 mg
	Rendimiento del extracto	0,0720 mg mL ⁻¹	0,0848 mg mL ⁻¹

Asimismo, al tratarse de un *screening* y desconociendo, por tanto, el comportamiento de los endófitos, dichas condiciones fueron de tipo estándar, con el objetivo de ajustarlas en posteriores ensayos y optimizar el rendimiento y la producción de los posibles metabolitos bioactivos (Venugopalan y Srivastava, 2015).

Como resultado, el tiempo de cultivo fue prácticamente de una semana en ambos casos, lo que coincide con otros estudios de carácter prospectivo, que necesitaron de tiempos de entre 7 y 15 días (Zhao *et al.*, 2014; Khiralla *et al.*, 2015; Arora *et al.*, 2016). Si bien se sugiere que alargar el tiempo de incubación podría llevar a mayores concentraciones del hongo (Gasong y Tjandrawinata, 2016) no se puede garantizar que este tiempo extra no afecte a la composición del extracto crudo, especialmente una vez consumida la glucosa. En esta

situación, el hongo podría consumir otros compuestos presentes en el medio que condicionaran su metaboloma o activar rutas metabólicas alternativas para obtener carbono que requirieran de energía e impidieran un crecimiento indefinido. Esto se debe a que las alteraciones en el proceso de nutrición pueden suponer auto-regulaciones del metabolismo, cambios en el ciclo celular e incluso la inducción de procesos de autólisis o autofagia (Watkinson, 2016b). Por todo ello, se optó por un período de estrés controlado, suficiente para favorecer la producción de metabolitos secundarios, pero sin que supusiera un factor determinante en lo que respecta a su actividad.

En este sentido, el peso del extracto obtenido está en consonancia con otros resultados como los de Dzoyem *et al.* (2017), que obtuvieron 19,1 mg a partir de *Epicoccum nigrum*, y de Wijesekera *et al.* (2017), con un rendimiento de 18,23 mg. Puede considerarse por tanto que los rendimientos de los extractos crudos (obtenidos dividiendo el peso de cada extracto entre el volumen de medio utilizado para su cultivo) están dentro de los valores esperables. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el comportamiento de cada hongo es diferente y, por tanto, el rendimiento del extracto crudo puede variar ampliamente, especialmente en función de los compuestos sintetizados. Como consecuencia, el rendimiento del hongo y su bioactividad no tendrían por qué estar relacionados. Podría ser que se obtuvieran mayores cantidades de extracto crudo, pero que esto se debiera a una mayor presencia de ácidos grasos, que pueden tener menor interés que otros compuestos de menor peso molecular. Por ello, la maximización del rendimiento solo debería ser una prioridad una vez valorada su actividad biológica.

4.2 Actividad Antioxidante

Con el objetivo de comprobar la actividad antioxidante a partir de la captura de radicales libres se monitorizó el cambio en la densidad óptica de radicales de DPPH (Gülçin *et al.*, 2007). Dicha reacción fue visible gracias al viraje desde el púrpura hacia distintas intensidades de amarillo, dada la capacidad del DPPH de decolorarse en presencia de compuestos antioxidantes (Saha *et al.*, 2008).

En primer lugar, el valor de absorbancia de la solución de DPPH que se utilizó como *muestra control* fue de 2,19. A partir de este valor, se pudo calcular el porcentaje de captura de radicales (*Inhibitory Concentration*, IC) tanto del ácido ascórbico como de los hongos en

estudio mediante la ecuación ya presentada en el apartado de *Materiales y Métodos* (FÓRMULA 3.1)

$$\% \text{ Captura de Radiales} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \quad (3.1)$$

Obtenida la solución base de DPPH, se preparó la curva de calibración usando ácido ascórbico como referencia (TABLA 4.2 y FIGURA 4.1). Se realizó de esta manera para, por un lado, tener un compuesto conocido con el que comparar los resultados de los extractos, y a la vez servir como verificación del método utilizado. Así, considerando que el valor de IC₅₀ se encuentra normalmente en torno a los 5 µg mL⁻¹ (Geng *et al.*, 2015; Khiralla *et al.*, 2015; Dzoyem *et al.*, 2017), el valor obtenido puede considerarse dentro del margen de error (TABLA 4.2).

TABLA 4.2 Valores de absorbancia e IC del ácido ascórbico

Concentración (µg mL ⁻¹)	Absorbancia (DPPH)	IC (%)
100	0,038	97,05
50	0,039	96,98
25	0,039	96,98
10	0,071	94,50
5	0,689	46,59
4,52	-	50,00
1	1,184	8,22
0,5	1,27	1,55

La concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) mide la efectividad de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica. En este caso de la actividad antioxidante, se define como la cantidad de muestra necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Carmona-Jiménez *et al.*, 2014).

El valor de IC₅₀ se calculó a partir de la recta de regresión obtenida de la curva que relaciona la concentración de cada muestra con el porcentaje de captura de radicales (Khiralla *et al.*, 2015). En el caso del ácido ascórbico, el IC₅₀ que se estimó de esta forma (FIGURA 4.1) fue de 4,52 µg mL⁻¹, lo cual supone una fuerte capacidad antioxidante que explica su amplio uso en la industria alimentaria (Contat-Rodrigo *et al.*, 2017).

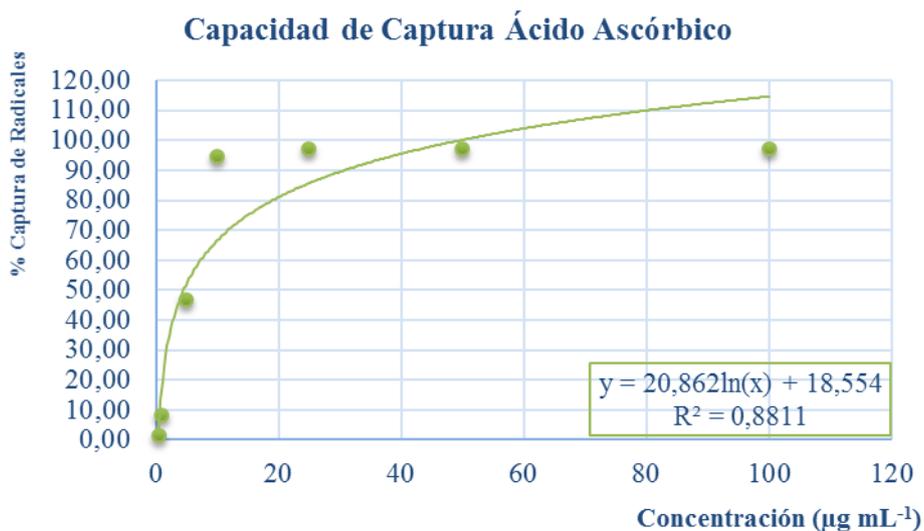


FIGURA 4.1 Curva de IC del ácido ascórbico

Por su parte, la curva de absorbancias del hongo 138 (TABLA 4.3; FIGURA 4.2) necesitó de mayores concentraciones de extracto crudo para mostrar actividad que en el caso del ácido ascórbico. Este hecho concuerda con la bibliografía, dado que los hongos en estudio suelen presentar capacidades antioxidantes sensiblemente menores que dicho ácido (Yadav *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Dzoyem *et al.*, 2017).

TABLA 4.3 Valores de absorbancia e IC del extracto crudo obtenido a partir del hongo 138

Concentración (µg mL ⁻¹)	Absorbancia (DPPH)	IC (%)
1200	0,119	90,80
600	0,556	56,90
201,18	-	50,00
300	0,684	47,00
150	0,875	32,19

A pesar de ello, sí que presenta una actividad similar a la de otros hongos relacionados, como en el caso de Khiralla *et al.* (2015), donde *Alternaria sp.* presentó un IC₅₀ de 236.0 ± 8.3 µg mL⁻¹. Hay que tener en cuenta que *Embellisia leptinellae* es un sinónimo homotípico de *Alternaria leptinellae* (Woudenberg *et al.*, 2013), por lo que ambos hongos compartirían género.

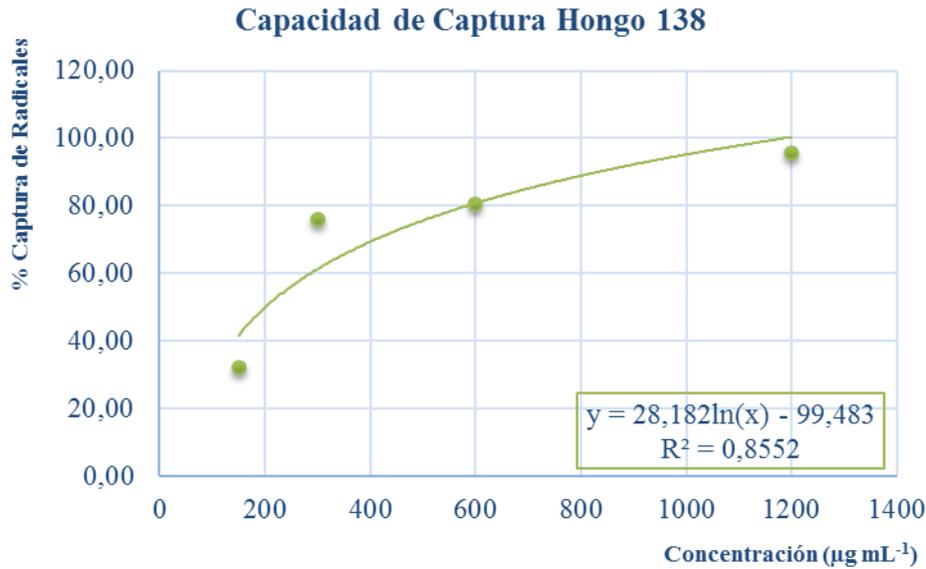


FIGURA 4.2 Curva de IC del extracto crudo del hongo 138

En lo que respecta al hongo 234, los resultados obtenidos fueron inconsistentes, incluso a pesar de ser repetidos. En este sentido, los valores de absorbancia medidos no tuvieron relación con la concentración de la muestra, presentando incluso una tendencia opuesta a la observada en el resto de casos (datos no mostrados).

Por tanto, a efectos del ensayo, se consideró que no mostraba actividad antioxidante. Existen otros ejemplos en los que los hongos que no pueden ser identificados (principalmente por su dificultad para esporular, como en el caso del 234) son los que presentan valores más altos de IC₅₀ (Khiralla *et al.*, 2015), lo que podría explicar el comportamiento de este.

Se pone de manifiesto así que, si bien el hongo 138 presenta una actividad antioxidante bastante menor que el ácido ascórbico, sí que está en consonancia con la de otros hongos estudiados (Jasmine y Agastian, 2013; Khiralla *et al.*, 2015). En este sentido, con las condiciones dadas para obtener el extracto crudo, este muestra una actividad razonable que podría invitar a estudiar más en profundidad su potencial como sustituto de otros compuestos antioxidantes sintéticos usados en la industria alimentaria.

4.3 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los hongos fue testada mediante la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria. Ésta es la mayor dilución (o menor concentración) del extracto que inhibe el crecimiento del organismo en estudio (Rajivgandhi *et al.*, 2016). Se suele utilizar, por tanto, para determinar la actividad de nuevos compuestos frente a diversos patógenos. En este ensayo se utilizaron, por su importancia, *Bacillus subtilis* y *Botrytis cinerea*.

Cabe destacar en primer lugar, que los dos extractos mostraron capacidad inhibitoria frente a ambos microorganismos. El descubrimiento de un efecto antipatogénico del extracto crudo del medio de cultivo o del micelio es el primer paso necesario para el descubrimiento de un nuevo antibiótico (Radic y Strukeljic, 2012).

Además, tanto el hongo 138 como el 234 mostraron la misma capacidad de inhibición frente a los dos patógenos utilizados, si bien es cierto que el extracto del hongo 234 presentó una actividad que duplicó a la del hongo 138 (FIGURA 4.3). El hecho de que este valor no variase en función del patógeno, permite pensar en la coexistencia de metabolitos con acciones antibióticas diferentes o bien que esta situación sea consecuencia de una sustancia cuya actividad antibiótica sea, en cierto modo, inespecífica (de Felício *et al.*, 2015).

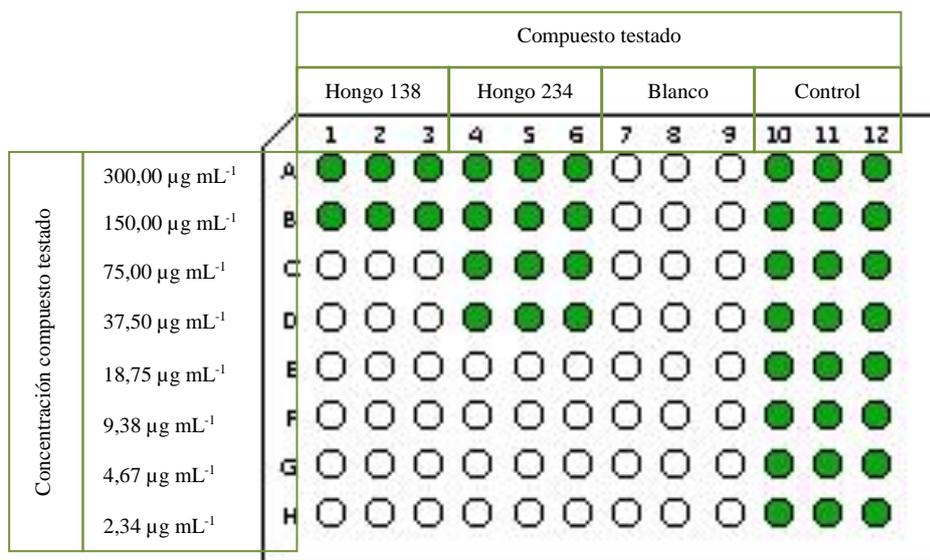


FIGURA 4.3 Actividad inhibitoria mostrada por ambos hongos frente a los patógenos

Como puede verse en la TABLA 4.4, la Concentración Mínima Inhibitoria del hongo 138 fue de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que en el caso del hongo 234, esta fue de $37,50 \mu\text{g mL}^{-1}$. En este sentido, ambos son valores aceptables de inhibición, siendo, en general, mejores que los obtenidos en otros estudios como Egan *et al.* (2016) o de Felício *et al.*, 2015, cuyas concentraciones para inhibir *Staphylococcus aureus* (una Gram positiva como *Bacillus subtilis*) están mayoritariamente por encima de los $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

TABLA 4.4 Capacidad de inhibición del crecimiento de patógenos mostrada por los hongos endófitos

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Hongo 138	$150,00 \mu\text{g mL}^{-1}$	$150,00 \mu\text{g mL}^{-1}$
Hongo 234	$37,50 \mu\text{g mL}^{-1}$	$37,50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Asimismo, el hongo 234 presenta una capacidad inhibitoria similar al alternariol 9-metil éter, una micotoxina producida por *Alternaria spp.*, que tiene una bioactividad frente a *Bacillus subtilis* de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ o de $37,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Staphylococcus haemolyticus* (Gram positiva), y que se considera que tiene un gran potencial como compuesto antimicrobiano (Lou *et al.*, 2016). Por ello, aunque no haya mostrado la misma capacidad de inhibición que la penicilina o la ciclohexamida usados como control, el hongo 234 puede considerarse de suficiente interés como para profundizar en los análisis para conocer los metabolitos implicados en su acción.

4.4 Ensayo de bioactividad dirigida del extracto crudo

Estimada la actividad antimicrobiana de los hongos, el siguiente paso consistió en intentar identificar los compuestos responsables de dicha inhibición. Para ello, se procedió a un semi-fraccionamiento por tiempo de ambos extractos. Dado que el tiempo de trabajo del HPLC fue de 40 minutos, a razón de 30 segundos por posición, cada muestra pudo recogerse completamente en una placa microtiter de 96 pocillos.

Una vez completamente evaporados, los 80 pocillos fueron inoculados con un cultivo de *Bacillus subtilis*, del mismo modo que en el caso de la evaluación de la concentración mínima inhibitoria. Esto permitió determinar los pocillos en los que hubo algún tipo de

actividad antimicrobiana, y acotar, por tanto, los tiempos en los que se obtuvo un compuesto con capacidad inhibitoria. Esta acción facilitaría su posterior identificación y caracterización a través del cromatograma asociado obtenido del HPLC.

De esta forma, en el caso del hongo 138, el fraccionamiento permitió ver que las celdas inhibidas fueron las B4 y C4, lo que se corresponde con un tiempo de retención de entre 14,5 y 15,5 (FIGURA 4.4).

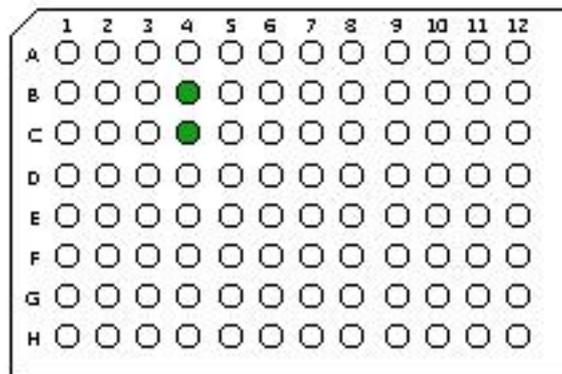


FIGURA 4.4 Pocillos con actividad inhibitoria del semi-fraccionado del extracto crudo del hongo 138

Por su parte, el extracto del hongo 234 presentó un mayor número de celdas con actividad antimicrobiana, si bien, éstas se recogieron de forma más tardía que en el caso anterior, tal y como se muestra en la FIGURA 4.5. Se observaron así tres grupos de inhibición, el primero entre los pocillos E6, F6 y G6 (20,5 a 22 minutos); el segundo entre B7 y C7 (24,5 a 25,5 minutos); y el último entre C9 y D9 (33 a 34 minutos).

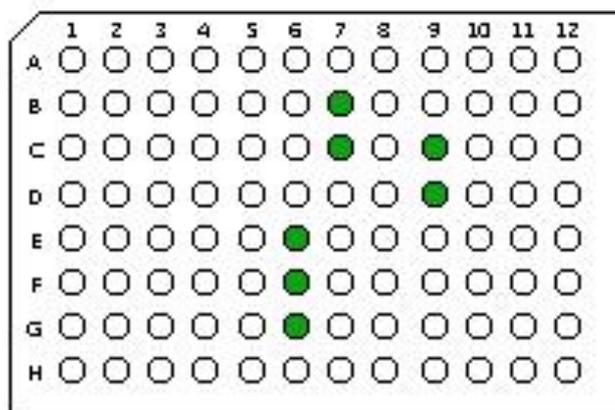


FIGURA 4.5 Pocillos con actividad inhibitoria del semi-fraccionado del extracto crudo del hongo 234

4.5 Identificación química de los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana

Por último, se intentó identificar los compuestos bioactivos, cuyos tiempos de retención quedaron delimitados por medio de los ensayos de bioactividad dirigida. Este paso es crucial para conocer la naturaleza de estos compuestos ya que, por ejemplo, su acción puede no ser individual, sino que sea consecuencia de una sinergia entre diferentes componentes del extracto crudo. Por ello, identificarlos y conocer su estructura es un punto clave para el posible desarrollo de un nuevo antibiótico (Radic y Strukelj, 2012).

En el caso del **hongo 138**, el ensayo de bioactividad dirigida solo mostró un intervalo de inhibición, entre los 14,5 y los 15,5 minutos, por lo que la identificación de metabolitos se restringió a dicho período de tiempo. En este sentido, el cromatograma de DAD mostró un pico potencialmente relevante a los 15,043 minutos (FIGURA 4.6).

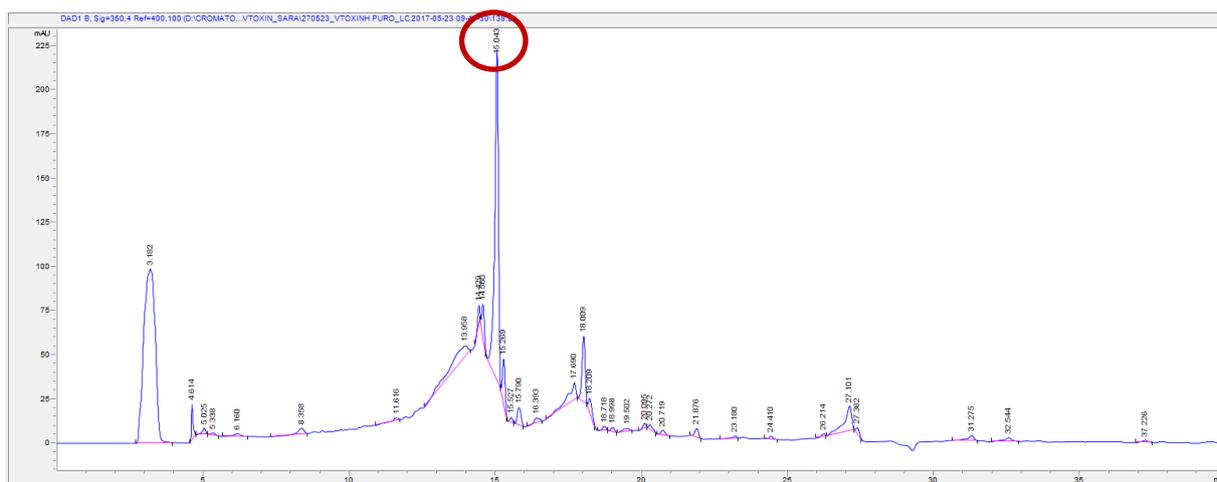


FIGURA 4.6 Cromatograma de espectro ultravioleta (DAD) del hongo 138

Dicho pico tuvo su correspondencia en ambos cromatogramas de masas, con tiempos cercanos a 15 minutos (-1) (FIGURA 4.7). Por ello, se consideró que este podría ser el tiempo de retención de la molécula con actividad antimicrobiana.

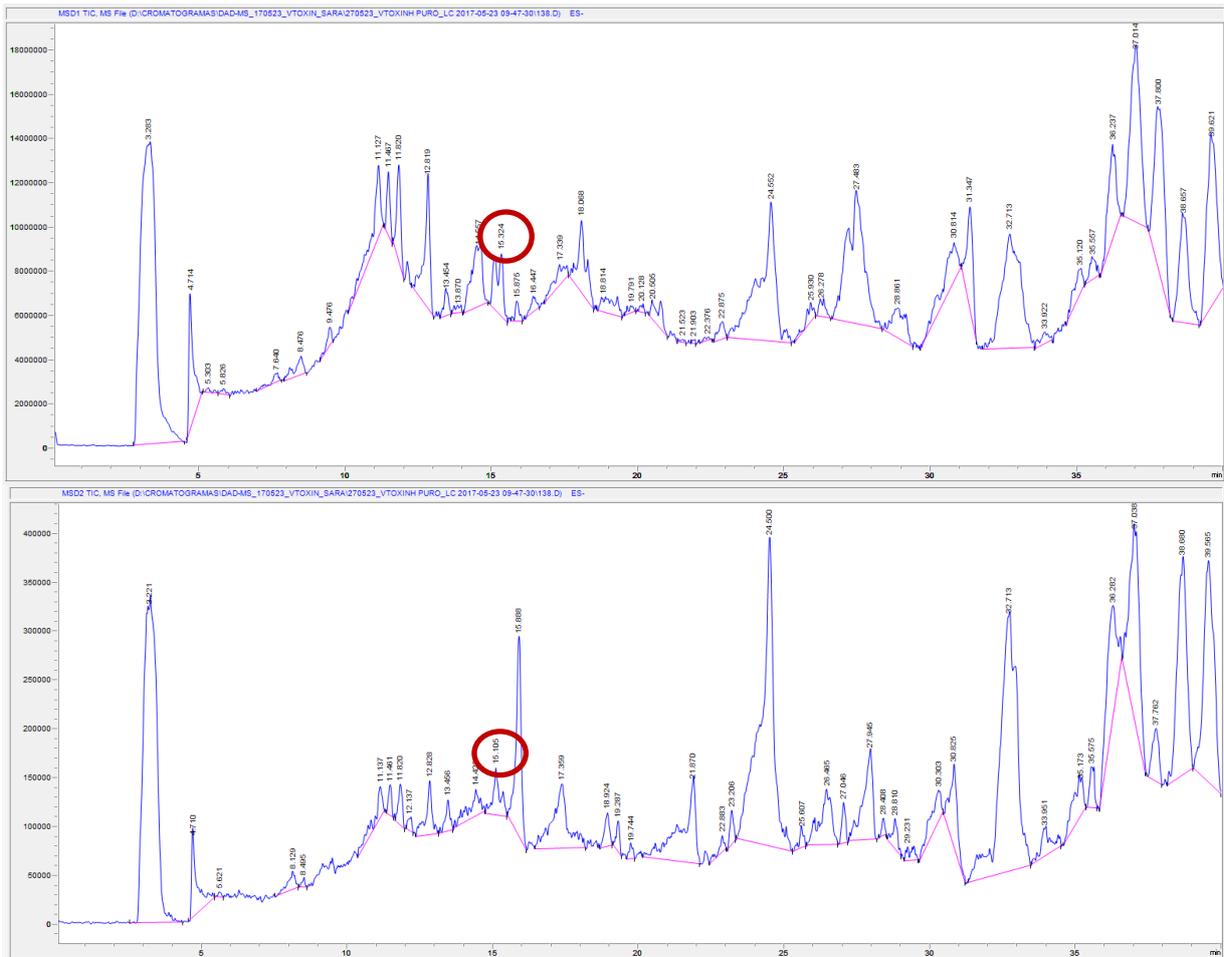


FIGURA 4.7 Cromatograma de masas positivo (superior) y negativo (inferior) del hongo 138

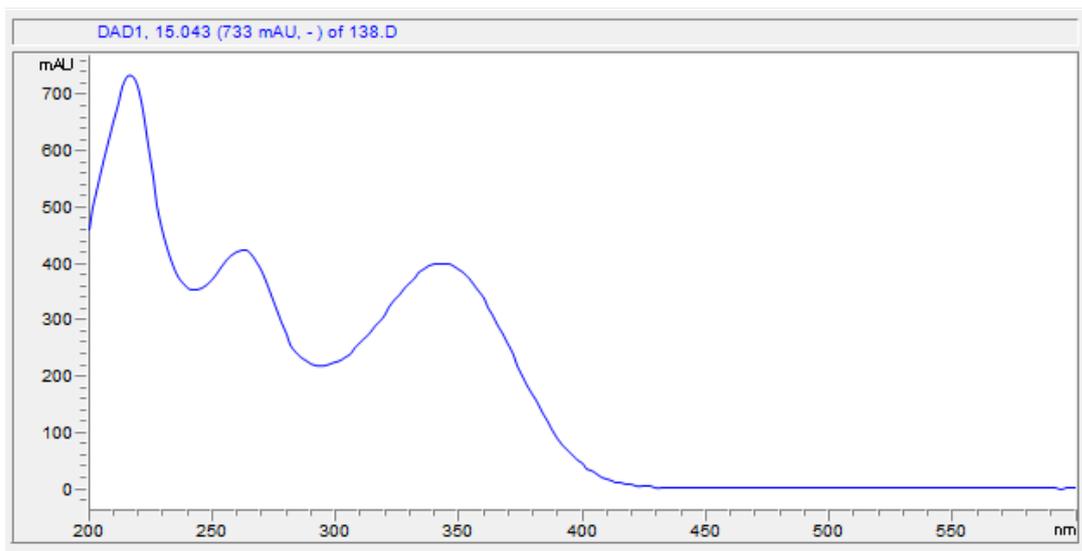


FIGURA 4.8 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 15,043 minutos (Hongo 138)

De esta forma, una vez identificado el posible tiempo de retención del metabolito bioactivo, se comprobó que el cromatograma del DAD mostraba sensibilidad en dicho punto,

mediante la oscilación en la línea base que arroja el detector (FIGURA 4.8). Posteriormente, se procedió a identificar la masa de la molécula a partir de los cromatogramas de masas positivo y negativo, buscando de nuevo un pico coincidente (FIGURA 4.9). En este caso, se consideró que la masa fue de aproximadamente 322 m/z, ya que los picos coincidentes fueron 323 m/z (+1) y 321 m/z (-1).

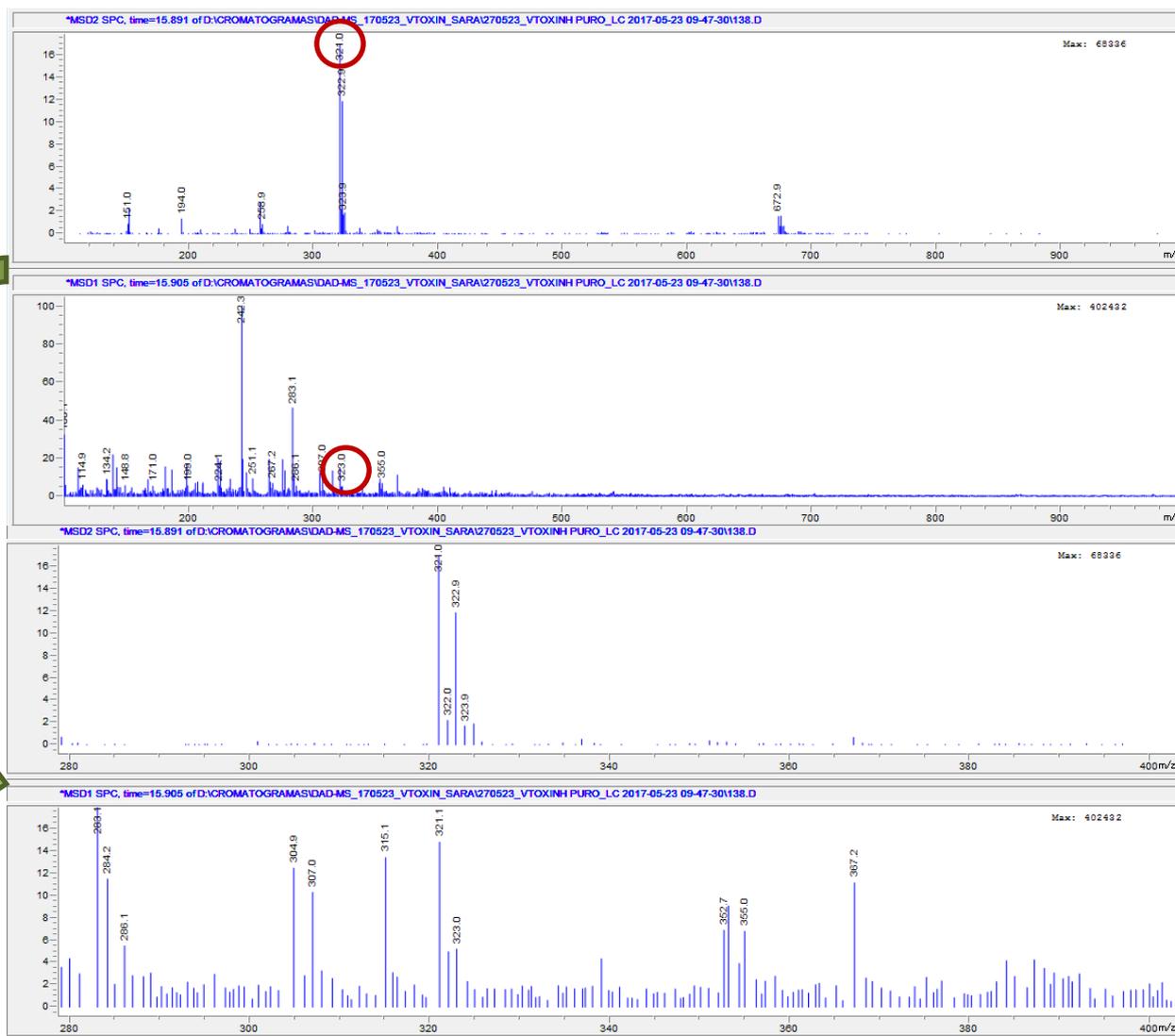


FIGURA 4.9 Cromatogramas de masas positivo (superior) y negativo (inferior) para el tiempo de retención estimado (Hongo 138)

Teniendo ya esta masa aproximada, se realizó el análisis de la muestra en el HPLC Q-TOF, que permitió fijar dicha masa de forma mucho más precisa en 321,0053 m/z (FIGURA 4.10).

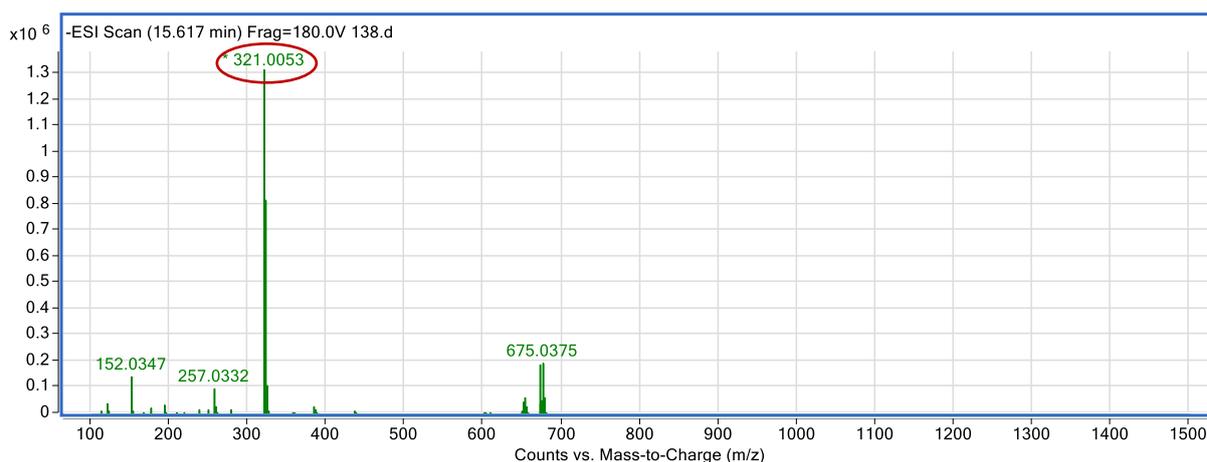


FIGURA 4.10 Cromatograma de masas para el tiempo de retención 15,617 minutos mediante HPLC Q-TOF

Por último, gracias a la base de datos del software utilizado, se pudo hacer una estimación de las fórmulas moleculares más posibles del metabolito con la masa dada. Así, de entre todas las opciones mostradas, se consideró que la más probable podría ser $C_{17}H_6O_7$, teniendo en cuenta que mostró el menor diferencial con respecto al valor obtenido y que la fórmula presentó una composición razonable, como por ejemplo en cuanto al equilibrio C-H (FIGURA 4.11).

Formula (M)	Ion Formula	Calc Mass	Calc m/z	Diff (ppm)	▲
C13 H6 O10	C13 H5 O10	321.9961	320.9888	-51.18	
C9 H8 N O12	C9 H7 N O12	322.0046	320.9974	-24.62	
C12 H6 N2 O9	C12 H5 N2 O9	322.0073	321.0001	-16.29	
C17 H6 O7	C17 H5 O7	322.0114	321.0041	-3.8	
C8 H8 N3 O11	C8 H7 N3 O11	322.0159	321.0086	10.27	
C10 H10 O12	C10 H9 O12	322.0172	321.0099	14.44	
C11 H6 N4 O8	C11 H5 N4 O8	322.0186	321.0113	18.59	
C13 H8 N O9	C13 H7 N O9	322.0199	321.0126	22.76	
C16 H6 N2 O6	C16 H5 N2 O6	322.0226	321.0153	31.08	
C21 H6 O4	C21 H5 O4	322.0266	321.0193	43.58	
C9 H10 N2 O11	C9 H9 N2 O11	322.0285	321.0212	49.32	
C12 H8 N3 O8	C12 H7 N3 O8	322.0311	321.0239	57.65	

FIGURA 4.11 Posibles fórmulas moleculares del metabolito para la masa dada (Hongo 138)

Asimismo, a partir de esta posible fórmula molecular se obtuvo su estructura química, identificándose como el compuesto 5,5'-Carbonylbis(2-benzofuran-1,3-dione) (FIGURA 4.12). Con esta identificación, se concluiría el análisis de la bioactividad del extracto crudo

del hongo 138. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto es solo una aproximación y que para identificar con garantías la molécula habría que continuar con el fraccionado total de la muestra, lo que no se ha incluido en el presente proyecto.

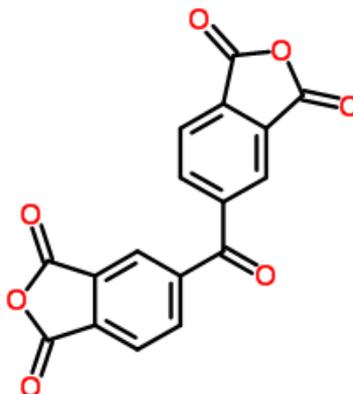


FIGURA 4.12 Estructura química del metabolito identificado a partir del hongo 138 (Chemspider, 2017a)

Por su parte, el ensayo de bioactividad dirigida del **hongo 234** arrojó unos resultados más complejos que en el caso anterior, al obtenerse hasta tres intervalos de inhibición independientes. Por ello, fue necesario estudiar cada uno de esos tiempos de retención de forma separada, con el fin de comprobar si dicha inhibición estuvo asociada a una molécula concreta y, en caso afirmativo, si esta última pudiera ser de interés. De nuevo, el primer paso consistió en cotejar el cromatograma del ultravioleta con los intervalos de retención obtenidos (FIGURA 4.13).

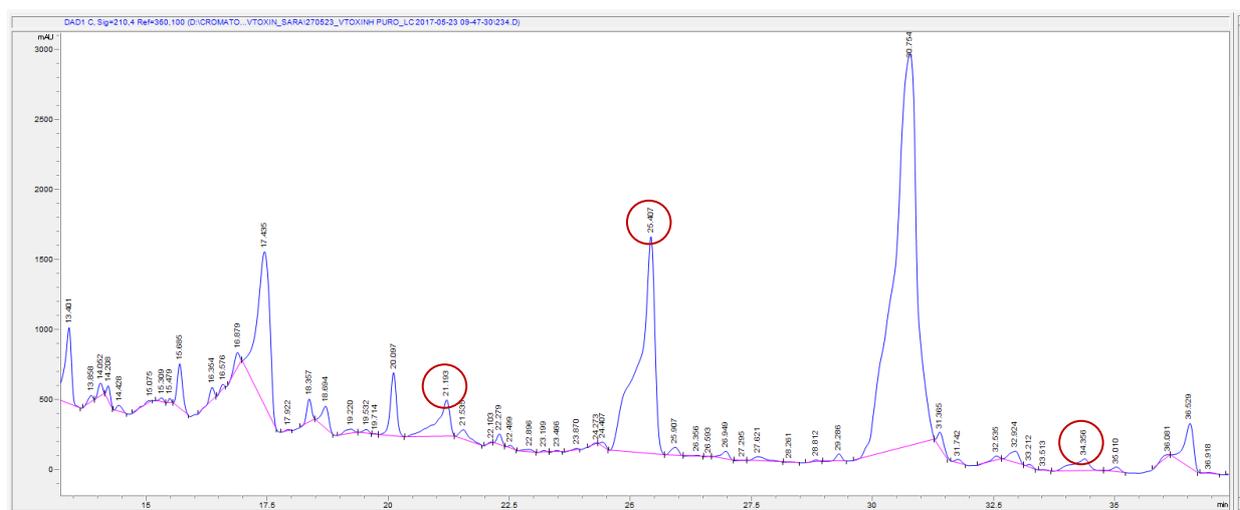


FIGURA 4.13 Cromatograma de espectro ultravioleta (DAD) del hongo 234

Se identificaron 3 picos con potencial para ser los responsables de la actividad antibacteriana dentro de cada intervalo. Los tiempos de retención de cada uno de estos picos fueron de 21,193; 25,407 y 34,356 minutos respectivamente. Si bien es cierto que el último punto queda ligeramente fuera del tiempo marcado por el ensayo de bioactividad, esta diferencia puede considerarse aceptable, teniendo en cuenta las variaciones que pueden introducir factores como la longitud de los capilares utilizados.

Los tiempos de retención obtenidos a partir del cromatograma de DAD fueron cruzados a su vez con los cromatogramas de masas, positivo y negativo. En los 3 casos se encontraron picos coincidentes (FIGURA 4.14), lo que permitió proseguir con el análisis de cada uno de ellos, esta vez ya por separado.

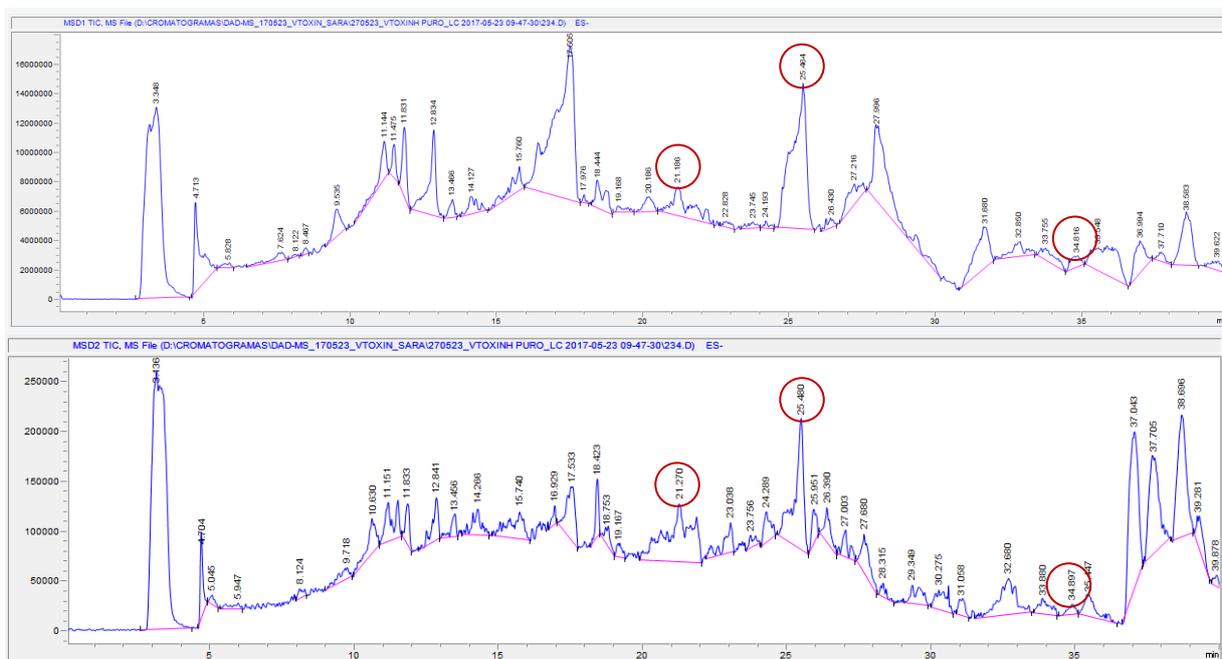


FIGURA 4.14 Cromatograma de masas positivo (superior) y negativo (inferior) del hongo

234

En primer lugar, se estudió el potencial del pico asociado a la bioactividad detectada en el minuto 21. Para ello, se obtuvo el cromatograma del DAD en el tiempo aproximado de retención (21,183 min), confirmándose la actividad gracias a la existencia de una oscilación en la línea base del detector (FIGURA 4.15).

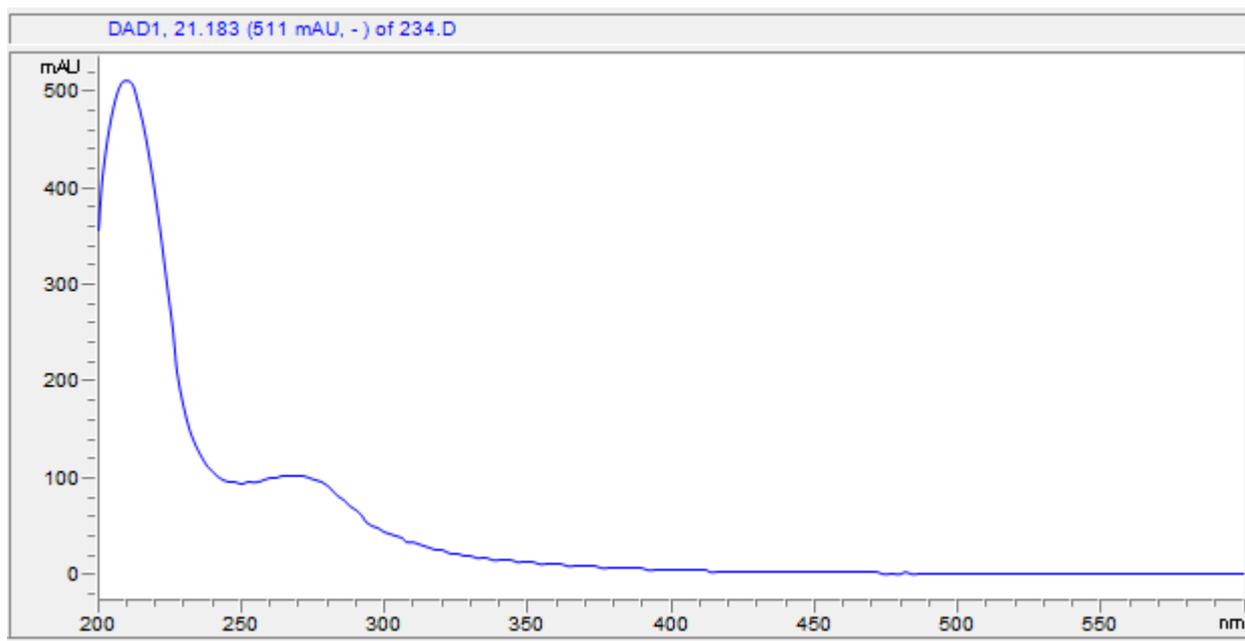


FIGURA 4.15 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 21,183 minutos (Hongo 234)

A partir del cromatograma del DAD, se localizó el peso de la molécula en los cromatogramas de masas. En el caso del cromatograma negativo, fue necesario ampliar la imagen para poder observar la masa. De esta forma se obtuvieron valores de 548,3 m/z (+) y 546,3 m/z (-) (FIGURA 4.16), lo que permitió fijar la masa de forma aproximada en 547,3 m/z.

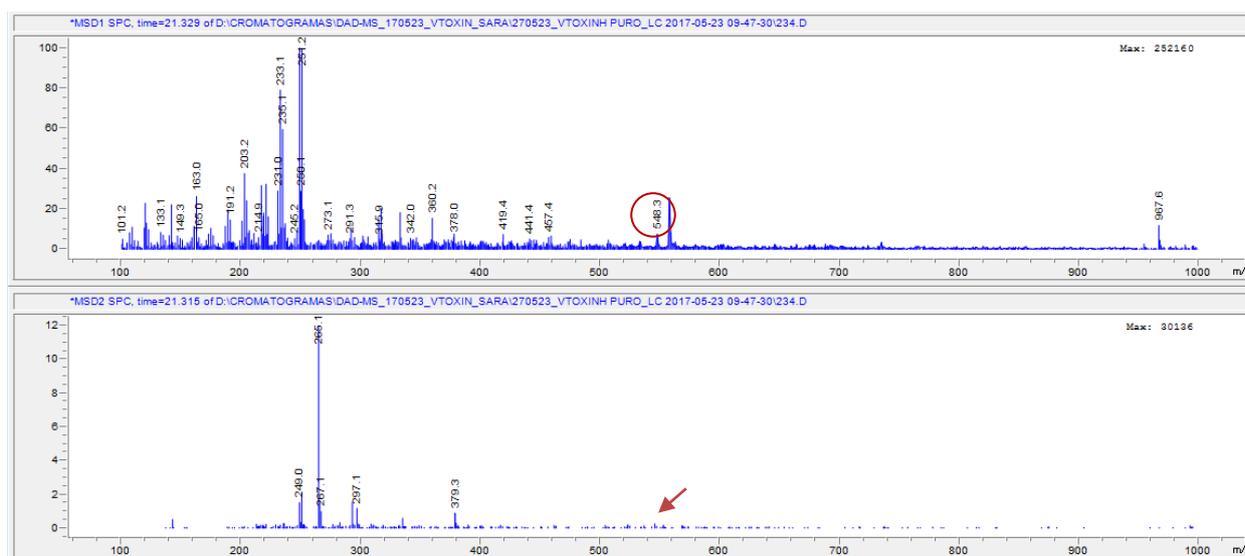


FIGURA 4.16 Cromatogramas de masas positivo (superior) y negativo (inferior) para el tiempo de retención estimado de 21,3 minutos (Hongo 234)

Para ajustar la masa de la molécula identificada, se llevó a cabo el análisis de la muestra en el HPLC Q-TOF. Se estudió el cromatograma resultante en el rango próximo al tiempo de retención, encontrándose la masa buscada a los 22,278 minutos (FIGURA 4.17). Esta diferencia con respecto al tiempo del DAD puede explicarse por el uso de equipos diferentes, que pueden introducir desplazamientos en los tiempos de retención, lo que no impide que los resultados sigan siendo válidos.

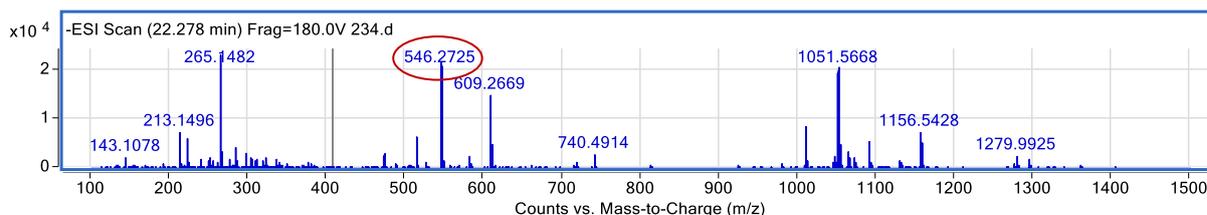


FIGURA 4.17 Cromatograma de masas para el tiempo de retención 22,278 minutos mediante HPLC Q-TOF

La masa obtenida gracias al Q-TOF fue de 546, 2725 m/z, dato que sirvió para estimar la fórmula molecular del primer metabolito del hongo 234, utilizando la base de datos disponible. En este sentido, de entre todas las opciones posibles, se consideró que la más probable podría ser $C_{32}H_{39}N_2O_6$ (FIGURA 4.18). Se eligió esta fórmula, además de por presentar un bajo diferencial (+1,89 ppm), por presentar un menor número de átomos de N, debido a que suelen ser más probables de encontrar de forma natural cuantos menos N tienen.

Una vez identificada la molécula responsable de la bioactividad en el minuto 21, se comenzó el mismo procedimiento, retomando la actividad detectada por el DAD en el minuto 25. Para ello, se observó dicho cromatograma en el minuto 25,395, el cual mostró una ligera actividad, como puede observarse en la FIGURA 4.20.

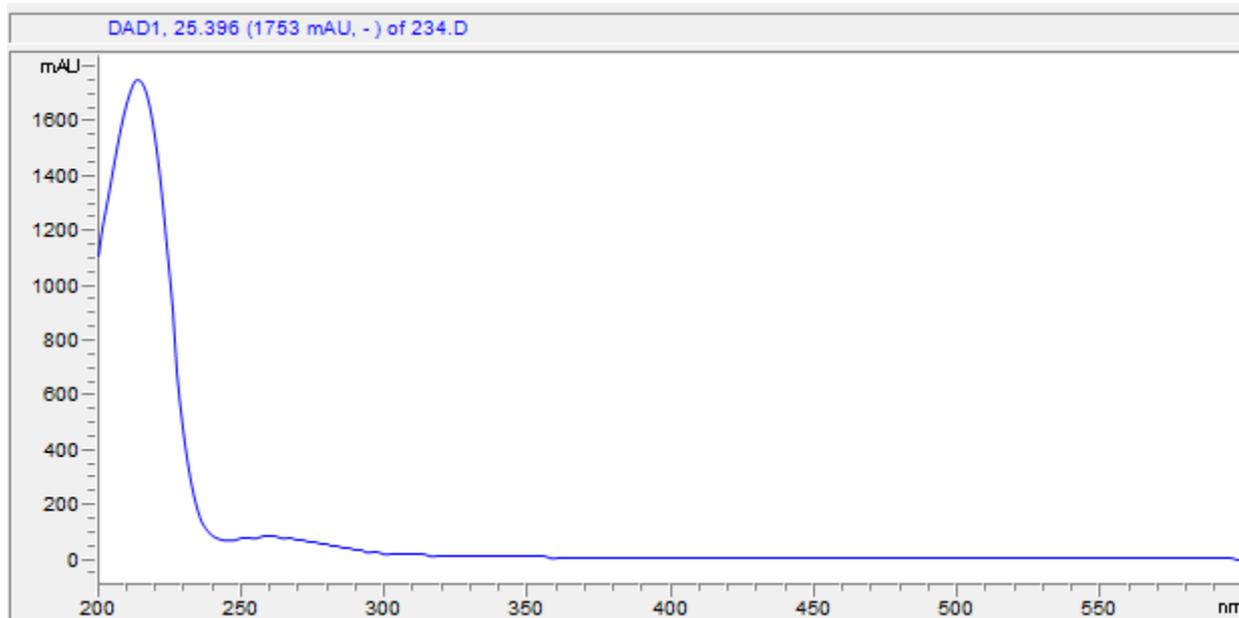


FIGURA 4.20 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 25,396 minutos (Hongo 234)

Sin embargo, al analizar el cromatograma de masas en dicho tiempo, no se encontró ninguna masa que permitiera suponer que la bioactividad registrada estuviese ligada a una molécula concreta, al no haber una correspondencia entre los cromatogramas positivo y negativo (FIGRA 4.21).

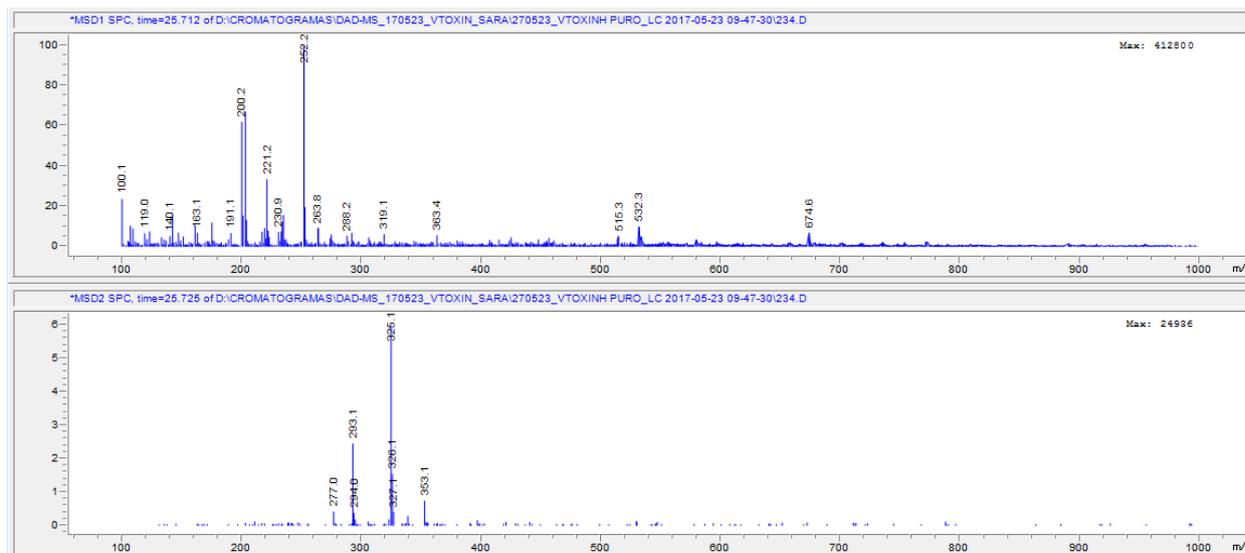


FIGURA 4.21 Cromatogramas de masas positivo (superior) y negativo (inferior) para el tiempo de retención estimado de 25,7 minutos (Hongo 234)

Con el fin de corroborar la ausencia de algún metabolito con actividad antimicrobiana, se comprobó el cromatograma del HPLC Q-TOF en el rango del tiempo de detección del DAD (25,540 minutos), pero tampoco se pudo encontrar una masa que coincidiera (FIGURA 4.22). Por ello, se consideró que la bioactividad en dicho intervalo no se debió a una molécula concreta o que, en su defecto, esta no se pudo identificar con el método utilizado.

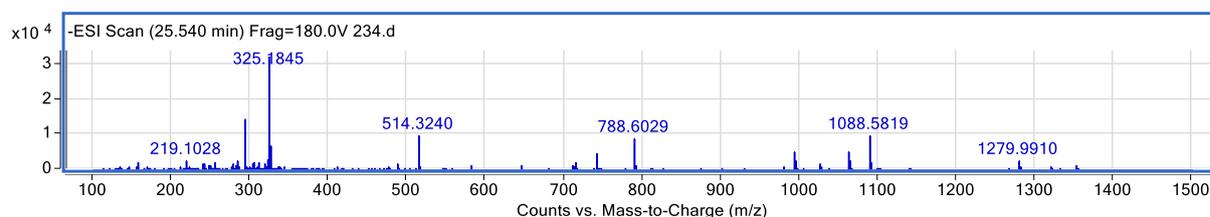


FIGURA 4.22 Cromatograma de masas para el tiempo de retención 25,540 minutos mediante HPLC Q-TOF

Algo parecido puede decirse en cuanto al último intervalo inhibición. A pesar de que el análisis preliminar de los cromatogramas de DAD y de masas parecían que sí podía existir una molécula bioactiva en dicho punto, un análisis más detallado del espectro ultravioleta a los 34,464 minutos permitió comprobar que esto no fue finalmente así (FIGURA 4.23).

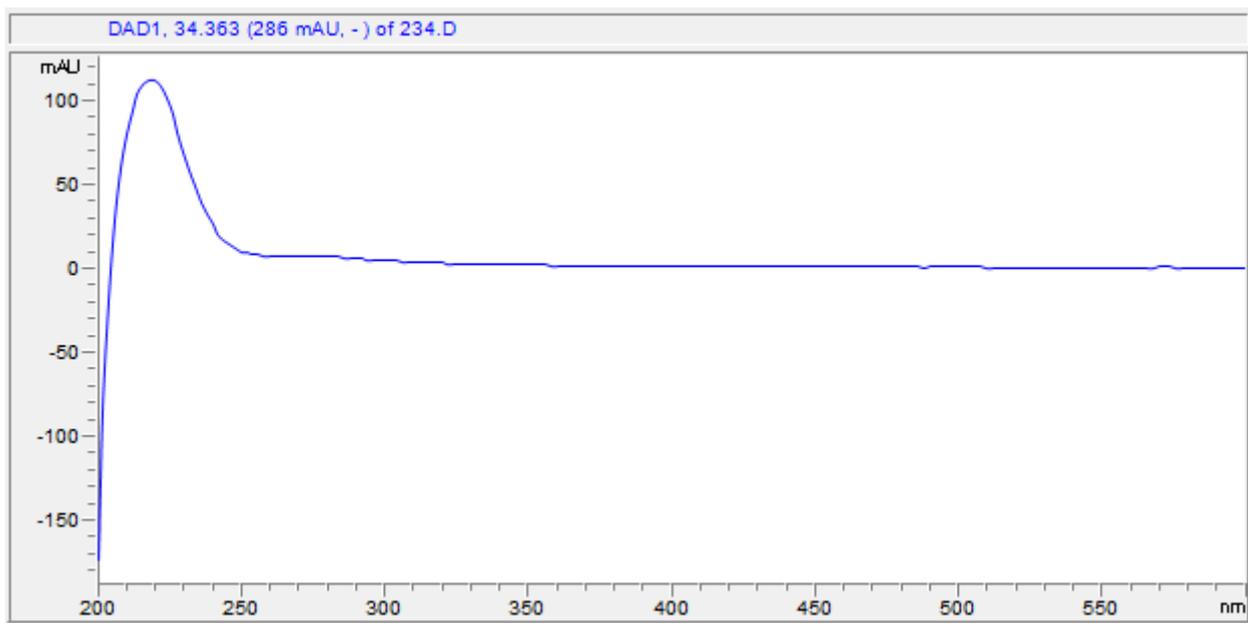


FIGURA 4.23 Cromatograma DAD para el tiempo de retención 34,363 minutos (Hongo 234)

El hecho de que hubiese bioactividad en dichos puntos puede deberse, entre otros, a moléculas muy grandes que aparecieran al final de prueba y que se fraccionaran durante el ensayo de bioactividad. En cualquier caso, incluso si existieran dichas moléculas, al no poder aislarse, no serían de utilidad en el contexto de la obtención de metabolitos secundarios.

Como siguiente paso, sería interesante, una vez identificados los metabolitos a través de un *MS/MS*, fraccionar la muestra para aislar estos compuestos y evaluar su actividad antimicrobiana, no solo frente a *Bacillus subtilis* sino frente a *Botrytis cinerea*. Se conseguiría conocer así el peso del metabolito en la inhibición total del extracto, sobre todo en el caso del hongo 234, donde no se logró identificar el origen de la bioactividad en 2 de los 3 intervalos. Además, y dado que solo se obtuvo un metabolito en cada caso, testar su actividad frente al hongo permitiría comprobar si en efecto el hecho de que no hubiese diferencia de inhibición según el patógeno fue gracias a la acción de una única molécula con una bioactividad más generalista.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente Trabajo Fin de Máster se han expuesto los resultados del ensayo planteado, consistente en la evaluación de la bioactividad de hongos endófitos aislados en el marco de la dehesa. Las conclusiones obtenidas a partir de dicho trabajo fueron las siguientes:

1. Las condiciones de cultivo de los hongos permitieron obtener rendimientos razonables para un *screening*. La optimización de este parámetro quedó supeditado a obtener resultados positivos.
2. El estudio de la actividad antioxidante arrojó resultados dispares. Mientras que el hongo 138 mostró una capacidad antioxidante moderada, no se obtuvieron resultados concluyentes del hongo 234.
3. La actividad antimicrobiana de ambos hongos no mostró diferencias cuantitativas en cuanto al patógeno utilizado. Independientemente de éste, el hongo 234 mostró una actividad que duplicó a la del hongo 138.
4. Se consiguió la identificación de un metabolito con actividad antimicrobiana por cada extracto estudiado. A pesar de ser necesaria una mayor profundización, esto abre la posibilidad de la identificación de compuestos novedosos que puedan ser útiles como elementos de biocontrol.

Como conclusión final puede decirse que los extractos crudos de hongos endófitos extraídos de plantas procedentes de la dehesa tienen potencial como elementos de biocontrol gracias a su actividad biológica, tanto antioxidante como antimicrobiana. Asimismo, el aislamiento de los metabolitos secundarios permite la posibilidad de obtener compuesto con una mayor eficacia. Por ello, se plantea la posibilidad de estudiar la acción *in vivo* de dichos extractos, así como la acción, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los metabolitos identificados.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahão, M.R.; Molina, G. y Pastore, G.M. (2013). Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. *Food Research International*, 52: 367-372.
- Adrio, J.L. y Demain, A.L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6 (3): 1919.
- Ahlholm, J.U.; Helander, M.; Lehtimäki, S.; Wäli, P. y Saikkonen, K. (2002). Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos*, 99: 173-183.
- Al-Fakih, A.A. (2014). Overview of the fungal metabolites involved in mycopathy. *Open Journal of Medical Microbiology*, 4: 38-63.
- Aly, A.H.; Debbab, A. y Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 18729-1845.
- Anderson, L.S. y Sinclair, F.L. (1993). Ecological interactions in agroforestry systems. *Agroforestry Abstracts*, 54 (6): 57-91.
- Aneja, M.; Gianfagna, T. y Hebbar, P. (2006). *Trichoderma* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 304-307.
- Arnold, A.E.; Mejía, L.C.; Kyllö, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N. y Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 15649-15654.
- Arora, D.; Sharma, N.; Singamaneni, V.; Sharma, V.; Kushwaha, M.; Abrol, V.; Guru, S.; Sharma, S.; Gupta, A.P.; Bhushan, A.; Jaglan, S. y Gupta, P. (2016). Isolation and characterization of bioactive metabolites from *Xylaria psidii*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Aegle marmelos* and their role in mitochondrial dependent apoptosis against pancreatic cancer cells. *Phytomedicine*, 23: 1312-1320.
- Aschehoug, E.T.; Metlen, K.L. y Callaway, R.M. (2012). Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forbs. *Ecology*, 939: 3-8.
- Asner, G.P.; Elmore, A.J.; Olander, L.P.; Martin, R.E. y Harris, A.T. (2004). Grazing systems, ecosystem responses, and global change. *Annual Review of Environment and Resources*, 29: 261-299.
- Backman, P.A y Sikora, R.A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46: 1-3.

- Bailey, B.A.; Bae, H.; Strem, M.D.; Roberts, D.P.; Thomas, S.E.; Crozier, J.; Samuels, G.J.; Choi, I.Y. y Holmes, K.A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224: 1149-1164.
- Baltruschat, H.; Fodor, J.; Harrach, B.D.; Niemczyk, E.; Barna, B.; Gullner, G.; Janeczko, A.; Kogel, K.H.; Schäfer, P.; Schwarczinger, I.; Zuccaro, A. y Skoczowski, A. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180: 501-510.
- Baynes, M.; Newcombe, G.; Dixon, L.; Castlebury, L. y O'Donnell, K. (2012). A novel plant-fungal mutualism associated with fire. *Fungal Biology*, 116: 133-144.
- Bode, H.B.; Bethe, B.; Höfs, R. y Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3: 619-627.
- Bohlmann, J. y Keeling, C.I. (2008). Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54: 656-669.
- Braca, A.; Tomasi, N.D.; Bari, L.D.; Pizza, C.; Politi, M. y Morelli, I. (2001). Natural antioxidants from plant material in phenolic compounds in food and their effects on health. *Journal of Natural Products*, 64: 892-895.
- Brakhage, A.A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 21-32.
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*: 79, 473-495.
- Carmona, C.P.; Azcárate, F.M.; Oteros-Rozas, E.; González, J.A. y Peco, B. (2013). Assessing the effects of seasonal grazing on holm oak regeneration: implications for the conservation of Mediterranean dehesas. *Biological Conservation*, 159: 240-247.
- Carmona-Jiménez, Y.; García-Moreno, M.V.; Igartuburu, J.M. y García Barroso, C. (2014). Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry*, 165: 198-204.
- Challinor, V.L. y Bode, H.B. (2015). Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354: 82-97.
- Chappell, L.H. y Wastling, J.M. (1992). Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitology*, 105: S2540.
- Chemspider (2017a). 5,5'-Carbonylbis(2-benzofuran-1,3-dione). Disponible en internet en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.68027.html>
- Chemspider (2017b). (7R)-N-(2-Hydroxybenzyl)-1,2,3-trimethoxy-N-methyl-9-oxo-10-[[(2R)-tetrahydro-2-furanylmethyl]amino]-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-

- aminium. Disponible en internet en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.68027.html>
- Chithra, S.; Jasim, B.; Sachidanandan, P.; Jyothis, M. y Radhakrishnan, E.K. (2014). Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, 21: 534-540.
- Comisión Europea. (2006). Development of Agri-Environmental Indicators for Monitoring the Integration of Environmental Concerns into the Common Agricultural Policy. Commission of the European Communities, Brussels.
- Contat-Rodrigo, L.; Pérez-Fuster, C.; Lidón-Roger, J.V.; Bonfiglio, A. y García-Breijo, E. (2017). Screen-printed Organic Electrochemical Transistors for the detection of ascorbic acid in food. *Organic Electronics*, 45: 89-96.
- Cubbage, F.; Balmelli, G.; Bussoni, A.; Noellemeyer, E.; Pachas, A.N.; Fassola, H.; Colcombet, L.; Rossner, B.; Frey, G.; Dube, F.; de Silva, M.L. Stevenson, H.; Hamilton, J. y Hubbard, W. (2012). Comparing silvopastoral systems and prospects in eight regions of the world. *Agroforestry Systems*, 86: 303-314.
- Daily, G.C. (1997). Nature's Services - Societal Dependence on Natural Ecosystems. Daily, G.C. (Ed.). Pp.: 392. Islands Press, Washington, DC.
- Daley, D.K.; Brown, K.J. y Badal S. (2017). Fungal Metabolites. En: *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*. Badal, S. y Degoda, R. (Eds.). Pp.413-421. Elsevier, Oxford.
- De Baets, S.; Vandedrincq, S. y Vandamme, E.J. (2000). Vitamins and related biofactors, microbial production. En: *Encyclopedia of microbiology*, volumen 4. Lederberg, J. (Ed.). Pp. 837-853. New York: Academic Press.
- de Felício, R.; Pavão, G.PB.; de Oliveira, A.L.L.; Erberta, C.; Conti, R.; Pupo, M.T.; Furtado, N.A.J.C.; Ferreira, E.G.; Costa-Lotufo, L.V.; Young, M.C.M.; Yokoya, N.S. y Debonsi, H.M. (2015). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 641-650.
- Demain, A.L. y Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69: 139.
- den Herder, M.; Moreno, G.; Mosquera-Losada, R.; Palma, J.; Sidiropoulou, A.; Freijanes, J.J.S.; Crous-Duran, J.; Paulo, J.; Tomé, M.; Pantera, A.; Papanastasis, V.; Mantzanas, K.; Pachana, P.; Papadopoulos, A.; Plieninger, T. y Burgess, P.J. (2016). Current extent and trends of agroforestry in the EU27. 2nd Edition. Disponible en:

- https://www.agforward.eu/index.php/en/current-extent-and-trends-of-agroforestry-in-the-eu27.html?file=files/agforward/documents/D1_2_Extent_of_Agroforestry.pdf
- Devari, S.; Jaglan, S.; Kumar, M.; Deshidi, R.; Guru, S.; Bhushan, S.; Kushwaha, M.; Gupta, A.P.; Gandhi, S.G.; Sharma, J.P.; Taneja, S.C.; Vishwakarma, R.A. y Shah, B.A. (2014). Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC-ESI-MS/MS analysis. *Phytochemistry*, 98: 183-189.
- Dewick, P.M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Díaz, M.; Pulido, F.J. y Marañón, T. (2003). Diversidad biológica y sostenibilidad ecológica y económica de los sistemas adhesados. *Ecosistemas*, 3. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/47885/1/Diversidad%20biol%C3%B3gica%20y%20sostenibilidad.pdf>
- Díaz, M. y Pulido, F. (2009). Dehesas perennifolias de *Quercus ssp*, En: Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario presentes en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Ed.). Pp.: 127-160. Madrid.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E. y Romagni, J.G. (2000a). Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, 19: 583-589.
- Duke, S.O.; Dayan, F.E. y Rimando, A.M. (2000b). Natural products and herbicide discovery. En: *Herbicides and their Mechanisms of Action*. Cobb, A.H. y Kirkwood, R.C. (Eds.). Pp. 105-133. Academic Press, Sheffield.
- Dzoyem, J.P.; Melong, R.; Tsamob, A.T.; Maffo, T.; Kapche, D.G.W.F.; Ngadjui, B.T.; McGawa, L. y Eloff, J.N. (2017). Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27: 251–253.
- Egan, J.M.; Kaur, A.; Raja, H.A.; Kellogg, J.J.; Oberlies, N.H. y Cech, N.B. (2016). Antimicrobial fungal endophytes from the botanical medicine goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Phytochemistry Letters*, 17: 219-225.
- Eichhorn, M.P.; Paris, P.; Herzog, F.; Incoll, L.D.; Liagre, F.; Mantzanas, K.; Mayus, M.; Moreno, G.; Papanastasis, V.P.; Pilbeam, D.J.; Pisanelli, A. y Dupraz, C. (2006). Silvoarable systems in Europe – past, present and future prospects. *Agroforestry Systems*, 67: 29-50.

- Eljounaidi, K.; Lee, S.K. y Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*, 103: 62-68.
- Escribano, M.; Rodríguez de Ledesma, A.; Mesías, F.J. y Pulido, f. (2001). Ripología de sistemas adhesionados. *Archivos de Zootecnia*, 50 (191): 411-414.
- Fagerholm, N.; Torralba, M; Burgess, P.J. y Plieninger, T. (2016). A systematic map of ecosystem services assessments around European agroforestry. *Ecological Indicators*, 62: 47-65.
- Gasong, B.T. y Tjandrawinata, R.R. (2016). Production of secondary metabolite E2.2 from *Phaleria macrocarpa* endophytic fungus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (10): 881-885.
- Gaspar, P.; Mesías, F.J.; Escribano, M.; Rodríguez de Ledesma, A. y Pulido, F. (2007). Economic and management characterization of dehesa farms: implications for their sustainability. *Agroforestry Systems*, 71 (3): 151-162.
- Gaspar, P.; Escribano, M. y Mesías, F.J. (2016). A qualitative approach to study social perceptions and public policies in dehesa agroforestry systems. *Land Use Policy*, 58: 427-436.
- Geng, D.; Chi, X.; Donga, Q. y Hu, F. (2015). Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Industrial Crops and Products*, 67: 492-497.
- Gómez-Gutiérrez, J.M. y Pérez-Fernández, M. (1996). The dehesas, silvopastoral systems in semiarid Mediterranean regions with poor soils, seasonal climate and extensive utilization. En: *Western European silvopastoral systems*. Etienne, M. (Ed.). INRA, Francia.
- Gülçin, İ.; Elmastaş, M. y Aboul-Enein, H.Y. (2007). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21: 354-361.
- Guo, B.; Wang, Y.; Sun, X. y Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 136-142.
- Gutiérrez, R.M.; González, A.M. y Ramírez, A.M. (2012). Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. *Current Medicinal Chemistry*, 19: 2992-3030.
- Haines-Young, R. y Potschin, M. (2010). The links between biodiversity, ecosystem services and human well-being. En: *Ecosystem Ecology: A New Synthesis*. Raffaelli, D.G. y Frid, C.L.J. (Eds.). Pp. 110-139. Cambridge University Press, Cambridge.

- Halecker, S.; Surup, F.; Kuhnert, E.; Mohr, K.I.; Brock, N.L.; Dickschat, J.S.; Junker, C.; Schulz, B. y Stadler, M. (2014). Hymenoseitin, a 3-decalinoyltetramic acid antibiotic from cultures of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Phytochemistry*, 100: 86-91.
- Harper, J.K.; Arif, A.M.; Ford, E.J.; Strobel, G.A.; Porco Jr, J.A.; Tomer, D.P. Oneill, K.L.; Heider, E.M. y Grant, D.M. (2003). Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, 59 (14): 2471-2476.
- Hendry, S.J.; Boddy, L. y Lonsdale, D. (2002). Abiotic variables effect differential expression of latent infections in beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 155: 449-460.
- Herzog, F. (1997). Konzeptionelle Überlegungen zu Agroforstwirtschaft als Landnutzungsalternative in Europa. *Zeitschrift für Kulturtechnik und Landentwicklung*, 38 (1): 32-35.
- Hubbard, M.; Germida, J.J. y Vujanovic, V. (2014). Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 109-122.
- Hyde, K.D. (2005). Tropical fungi. En: *The Fungal Community; its Organization and Role in the Ecosystem*. Dighton, J.; White, J.F. y Oudemans, P. (Eds.). Pp.: 93-115. Taylor and Francis, Boca Ratón.
- Hyde, K.D. y Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.
- Jasmine, J. y Agastian, P. (2013). *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* alpha glucosidase activity of endophytic actinomycetes isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of pharmacy research*, 6: 674-678.
- Kastner, T.; Rivas, M.J.I.; Koch, W. y Nonhebel, S. (2012). Global changes in diets and the consequences for land requirements for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 6868-6872.
- Keesman, K.J.; Graves, A.; van der Werf, W.; Burgess, P.J.; Palma, J.; Dupraz, C. y van Keulen, H. (2011). A system identification approach for developing and parameterising an agroforestry system model under constrained availability of data. *Environmental Modelling & Software*, 26: 1540-1553.
- Keller, N.P.; Turner, G. y Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews. Microbiology*, 3: 937-947.

- Khan, A.L.; Hamayun, M.; Kang, S.M.; Kim, Y.H.; Jung, H.Y.; Lee, J.H. y Lee, I.J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*, 12: 3.
- Khan, A.L.; Lee, I.J. (2013). Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. *BMC Plant Biology*, 13: 86.
- Khan, A.A.; Bacha, N.; Ahmad, B.; Lutfullah, G.; Farooq, U. y Cox, R.J. (2014). Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (11): 859-870.
- Khiralla, A.; Mohamed, I.; Thomas, J.; Mignard, B.; Spina, R.; Yagi, S. y Laurain-Mattar, D. (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(9): 701-704.
- Koul, M.; Meena, S.; Kumar, A.; Sharma, P.R.; Singamaneni, V.; Hassan, S.R.; Hamid, A.; Chaubey, A.; Prabhakar, A.; Gupta, P. y Singh, S. (2016). Secondary metabolites from endophytic fungus *Penicillium pinophilum* induce ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in pancreatic cancer cells. *Planta Medica*, 82: 344-355.
- Kremen, C.; Iles, A. y Bacon, C. (2012). Diversified farming systems: an agroecological, system-based alternative to modern industrial agriculture. *Ecology and Society*, 17 (4): 44-63.
- Kumaresan, V. y Suryanarayanan, T.S. (2002). Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, 9: 81-91.
- Kusari, S.; Hertweck, C. y Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19: 792-798.
- Leitao, A.L. y Enguita, F.J. (2014). Fungal extrolites as a new source for therapeutic compounds and as building blocks for applications in synthetic biology. *Microbiological Research*, 169: 652-665.
- Linares, A.M. (2007). Forest planning and traditional knowledge in collective woodlands of Spain: the dehesa system. *Forest Ecology and Management*, 249: 71-79.
- Liu, J.Y.; Liu, C.H.; Zou, W.X.; Tian, X. y Tan, R.X. (2002). Leptosphaerone, a metabolite with novel skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Helvetica Chimica Acta*, 85: 2664-2667.

- Lledó, S.; Rodrigo, S.M.; Poblaciones, M.J. y Santamaría, O. (2015). Biomass yield, mineral content and nutritive value of *Poa pratensis* as affected by fungal endophytes. *Mycological Progress*, 14: 67.
- Lledó, S.; Rodrigo, S.M.; Poblaciones, M.J. y Santamaría, O. (2016). Biomass yield, nutritive value and accumulation of minerals in *Trifolium subterraneum* L. as affected by fungal endophytes. *Plant and Soil*, 405: 197-210.
- López-Sánchez, A.; San Miguel, A.; Dirzo, R. y Roig, S. (2016a). Scattered trees and livestock grazing as keystone organisms for sustainable use and conservation of Mediterranean dehesas. *Journal for Nature Conservation*, 33: 58-67.
- López-Sánchez, A.; Perea, R.; Dirzo, R. y Roig, S. (2016b). Livestock vs. wild ungulate management in the conservation of Mediterranean dehesas: Implications for oak regeneration. *Forest Ecology and Management*, 362: 99-106.
- Lorenz, K. y Lal, R. (2014). Soil organic carbon sequestration in agroforestry systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34: 443-454.
- Lou, J.; YU, R.; Wang, X.; Mao, Z.; Fu, L.; Liu, Y. y Zhou, L. (2016). Alternariol 9-methyl ether from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01 and its bioactivities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 96-101.
- Ludueña, L.M.; Taurian, T.; Tonelli, M.L.; Angelini, J.G.; Anzuay, M.S.; Valetti, L.; Muñoz, V. y Fabra, A.I. (2012). Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *European Journal of Soil Biology*, 53: 48-55.
- Márquez, L. y Redman, R. (2007). A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, 315: 513-515.
- Matata, P.Z.; Gama, B.M.; Mbwaga, A.; Mpanda, M. y Bya-mungu, D.A. (2011). Effect of *Sesbania sesban* fallows on *Striga* infestation and maize yield in Tabora Region of Western Tanzania. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 2: 311-317.
- McAdam, J.H.; Burgess, P.J.; Graves, A.R.; Rigueiro-Rodríguez, A. y Mosquera-Losada, M. (2009). Classifications and functions of agroforestry systems in Europe. En: *Agroforestry in Europe*. Rigueiro-Rodríguez, A.; McAdam, J. y Mosquera-Losada, M. (Eds.). Pp. 21–41. Springer, Países Bajos.
- Mei, C. y Flinn, B.S. (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4: 81-95.

- Mejía, L.C.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, A.E.; Hebbar, P.; Samuels, G.J.; Robbins, N. y Herre, E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46: 4-14.
- Michalczyk, A.; Cieniecka-Rosłonkiewicz, A. y Cholewinska, M., 2014. Plant endophytic fungi as a source of paclitaxel. *Herba Polonica*, 60: 22-33.
- Morales Rodrigo, S. (2011). Dinámica productiva de forrajes de diferentes cultivares de triticales y avenas como suplemento de los pastos de dehesa y pastizales del S.O. de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Moreno, G. y Pulido, F. (2008) The functioning, management and persistence of dehesas. En: *Agroforestry in Europe. Current Status and Future Prospects*. Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada MR (eds). Pp 127-160. Springer, Países Bajos.
- Moreno, G. y Pulido, F.J. (2009). The functioning, management and persistence of dehesas. En: *Agroforestry in Europe: current status and future prospects*. Rigueiro, A.; Mosquera, M.R. y McAdams, J. (Eds.). Pp.; 127–160. Springer Science, Berlín.
- Moretti, A. y Sarocco, S. (2016). Fungi. En “*Encyclopedia of Food and Health*”. Caballero, B.; Finglas, P.M. y Toldrá, F. (Eds.). Pp. 162-186. Elsevier, Oxford.
- Moricca, S. y Ragazzi, A. (2008). Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*, 98: 380-386.
- Mosquera-Losada, M.R.; McAdam, J.H.; Romero-Franco, R.; Santiago-Freijanes, J.J. y Rigueiro-Rodríguez, A. (2009). Definitions and components of agroforestry practices in Europe. En: *Agroforestry in Europe: current status and future prospects*. Pp.: 3–20. Rigueiro-Rodríguez, A.; McAdam, J. y Mosquera-Losada, M.R. (Eds.) Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht.
- Mycobank (2017). *Embellisia leptinellae*. Classification and associated data. Disponible en: <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=42622&Fields=All>
- Naik, B.S.; Shashikala, J. y Krishnamurthy, Y.L. (2009). Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiological Research*, 164: 290-296.
- Nair, P. (1993). *An Introduction to Agroforestry*. Pp. 494. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Nair, P.; Kumar, B.M. y Nair, V.D. (2009). Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172 (1): 10-23.
- Nerlich, K.; Graeff-Hönniger, S. y Claupein, W. (2013). Agroforestry in Europe: a review of the disappearance of traditional systems and development of modern agroforestry

- practices, with emphasis on experiences in Germany. *Agroforestry Systems*, 87: 475-492.
- Nisa, H.; Kamili, A.N.; Nawchoo, I.A.; Shafi, S.; Shameem, N. y Bandh, S.A. (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, 82: 50-59.
- Olea, L.; Paredes, J. y Verdasco, M.P. (1990). Características productivas de los pastos de las dehesas del S.O. de la Península Ibérica. *Pastos*, 20-21: 131-156
- Olea L., Lopez-Bellido R.J. y Poblaciones M.J. (2005) European types of silvopastoral systems in the Mediterranean area: dehesa. En "Silvopastoralism and Sustainable Land Management". Mosquera-Losada M.R. (Ed.). Pp. 30-35. CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire.
- Olea, L. y San Miguel-Ayanz, A. (2006). The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. *Grassland Science in Europe*, 11: 3-13.
- Oses, R.; Valenzuela, S.; Freer, J.; Sanfuentes, E. y Rodríguez, J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, 33: 77-86.
- Palem, P.P.; Kuriakose, G.C. y Jayabaskaran, C. (2015). An endophytic fungus *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. *PLoS One*, 10 (12): e0144476.
- Palma, J.; Graves, A.R.; Burgess, P.J.; van der Werf, W. y Herzog, F. (2007). Integrating environmental and economic performance to assess modern silvoarable agroforestry in Europe. *Ecological Economics*, 63: 759-767.
- Park, Y.H.; Chung, J.Y.; Ahn, D.J.; Kwon, T.R.; Lee, S.K.; Bae, I.; Yun, H.K. y Bae, H. (2015). Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. *Biological Control*, 91: 71-81.
- Patil, R.H.; Patil, M.P. y Maheshwari, V.L. (2016). Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi: A Review of Biotechnological Production and Their Potential Applications. En "Studies in Natural Products Chemistry Volume 49". Atta-ur-Rahman (Ed.) Pp. 189-205. Elsevier, Ámsterdam.
- Peñuelas, J.; Rico, L.; Ogaya, R.; Jump, A.S. y Terradas, J. (2012). Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biology*, 14: 565-575.

- Pereira, H.M.; Domingos T, y Vicente, L. (2004) Portugal Millennium Ecosystem Assessment: State of the Assessment Report. Centro de Biología Ambiental de la Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Plieninger, T. y Wilbrand, C. (2001). Land use, biodiversity conservation, and rural development in the dehesas of Cuatro Lugares, Spain. *Agroforestry Systems*, 51: 23-34.
- Plieninger, T. (2007). Compatibility of livestock grazing with stand regeneration in Mediterranean holm oak parklands. *Journal for Nature Conservation*, 15: 1-9.
- Plieninger, T.; Hartel, T.; Martín-López, B.; Beaufoy, G.; Bergmeier, E.; Kirby, K.; Montero, M.J.; Moreno, G.; Oteros-Rozas, E. y Van Uytvanck, J. (2015). Wood-pastures of Europe: geographic coverage, social–ecological values, conservation management, and policy implications. *Biological Conservation*, 190: 70-79.
- Poblaciones, M.J.; Rodrigo, S. y Santamaría, O. (2013). Evaluation of the potencial of Peas (*Pisum sativum* L.) to be used in selenium biofortification programs under Mediterranean conditions. *Biological Trace Element Research*, 151: 132-137.
- Prihantini, A.I. y Tachibana, S. (2016). Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (2): 110-115.
- Primdahl, J.; Kristensen, L.S. y Busck, A.G. (2013). The Farmer and Landscape management; different roles, different policy approaches. *Geography Compass*, 7 (4): 300-314.
- Pulido, F. (2010). Diagnóstico de las producciones. Libro Verde de la Dehesa. Documento para el debate hacia una estrategia ibérica de gestión. Pulido, F. y Picardo, A. (Eds.). Pp. 27-42.
- Pumariño, L.; Sileshi, G.W.; Gripenberg, S.; Kaartinen, R.; Barrios, E.; Muchane, M.N.; Midega, C. y Jonsson, M. (2015). Effects of agroforestry on pest, disease and weed control: A meta-analysis. *Basic and Applied Ecology*, 16: 573-582.
- Radic, N. y Strukelj, B. (2012). Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 19: 1270-1284.
- Rahiman, S.; Tantry, B.A. y Kumar, A. (2013). Variation of antioxidant activity and phenolic content of some common home remedies with storage time. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 10 (1): 124-127.
- Rajivgandhi, G.; Vijayan, R.; Kannan, M.; Santhanakrishnan, M. y Manoharan, N. (2016). Molecular characterization and antibacterial effect of endophytic actinomycetes

- Nocardioopsis* sp. GRG1 (KT235640) from brown algae against MDR strains of uropathogens. *Bioactive Materials*, 1: 140-150.
- Rodrigo, S.; Santamaría, O.; López-Bellido, F.J.; y Poblaciones, M.J. (2013). Agronomic selenium biofortification of two-rowed barley under Mediterranean conditions. *Plant, Soil and Environment*, 59: 115-120.
- Rodriguez, R.J., Redman, R.S., Henson, J.M., 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9: 261-272.
- Rodriguez, R.J.; White Jr., J.F.; Arnold, A.E. y Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles, *New Phytologist*, 182: 314-330.
- Romeralo, C.; Santamaría, O.; Pando, V. y Diez, J.J. (2015). Fungal endophytes reduce necrosis length produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* seedlings. *Biological Control*, 80: 30-39.
- Rowe, E.C.; van Noordwijk, M.; Suprayogo, D.; Hairiah, K.; Giller, K.E. y Cadisch, G. (2001). Root distributions partially explain N-15 uptake patterns in *Gliricidia* and *Peltophorum* hedgerow intercropping systems. *Plant Soil*, 235 (2): 167-179.
- Saha, M.R.; Hasan, S.M.R.; Akter, R.; Hossain, M.M.; Alam, M.S.; Alam, M.A. y Mazumder, M.E.H. (2008). *In vitro* free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* linn. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 6 (2): 197-202.
- Santamaría, O.; Smith, D.R. y Stanosz, G.R. (2012). Interaction between *Diplodia pinea* or *Diplodia scrobiculata* and fungal endophytes isolated from pine shoots. *Canadian Journal of Forest Research*, 42: 1819-1826.
- Santamaría, O.; Lledó, S.; Poblaciones, M.J. y Romero, P.J. (2014). Influencia de diversos hongos endófitos sobre la producción y calidad del forraje en *Lolium rigidum*. Comunicación oral en la 53 Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP) celebrada en Potes (Cantabria) del 9 al 12 de junio de 2014.
- Santamaría, O.; Rodrigo, S.; Albarrán, A. y Olea, L. (2016). Producción y calidad del forraje de variedades de triticales cultivadas en condiciones de sombra, para su utilización en sistemas agroforestales. Comunicación oral en la 55ª Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, celebrada en Lugo-A Coruña del 26 al 29 de abril de 2016.

- Santos Filho, F.C.; da Silva Amaral, L.; Rodrigues-Filho, E. (2011). Composition of essential oils from *Cupressus lusitanica* and a Xylariaceous fungus found on its leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 485-490.
- Schardl, C.; Leuchtman, A. y Spiering, J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315-340.
- Schnabel, S.; Dahlgren, R.A. y Moreno-Marcos, G. (2013). Soil and water dynamics. En: *Mediterranean Oak Woodland Working Landscapes: Dehesas of Spain and Ranchlands of California*, Landscape Series 16. Campos, P.; Hutsinger, L.; Oviedo, J.L.; Starrs, P.F.; Díaz, M.; Standiford, R. y Montero, G. (Eds.). Pp.: 91-121. Springer-Verlag, Nueva York.
- Schulz, B. y Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A.K. y Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106: 996-1004.
- Segarra, G.; Casanova, E.; Bellido, D.; Odena, M.A.; Oliveira, E. y Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, 7: 3943-3952.
- Shaw, J.J.; Spakowicz, D.J.; Dalal, R.S.; Davis, J.H.; Lehr, N.A.; Dunican, B.F.; Orellana, E.A.; Narváez-Trujillo, A.; Strobel, S.A. (2015). Biosynthesis and genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate *Nigrograna mackinnonii* E5202H. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 3715-3728.
- Sieber, T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21: 75-89.
- Simmons, E.G. (1990). *Embellisia* and related teleomorphs. *Mycotaxon*, 38: 251-265.
- Simón, N.; Montes, F.; Díaz-Pinés, E.; Benavides, R.; Roig, S. y Rubio, A. (2013). Spatial distribution of the soil organic carbon pool in a Holm oak dehesa in Spain. *Plant Soil*, 366: 537-549.
- Singh, G.; Kapoor, I.P.S.; Singh, P.; Heluani, C.; Lampasona, M. y Catalan, C. (2010). Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1026-1031.

- Smith, J.; Pearce, B. y Wolfe, M. (2012). A European perspective for developing modern multifunctional agroforestry systems for sustainable intensification. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 27 (4): 323-332.
- Smith, J.; Pearce, B.D. y Wolfe, M.S. (2013). Reconciling productivity with protection of the environment: is temperate agroforestry the answer? *Renewable Agriculture and Food System*, 28: 80-92.
- Song, Y.C.; Huang, W.Y.; Sun, C.; Wang, F.W. y Tan, R.X. (2005). Characterization of graphis lactone A as the antioxidant and free radical scavenging substance from the culture of *Cephalosporium sp.* IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28 (3): 506-509.
- Squire, R.A. (1981). Ranking animal carcinogens. A proposed regulatory approach. *Science*, 214: 877-80.
- Stadler, M.; Wollweber, H.; Mühlbauer, A.; Henkel, T.; Asakawa, Y.; Hashimoto, T.; Ju Y.M.; Rogers, J.D.; Wetzstein, H.G. y Tichy, H.V. (2001). Secondary metabolite profiles, genetic fingerprints and taxonomy of *Daldinia* and allies. *Mycotaxonomy*, 77: 379-429.
- Stierle, A.; Stroble, G. y Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260: 214-216.
- Stone, J.K., Polishook, J.D. y White, J.F. (2004). Endophytic fungi. En: *Biodiversity of 24 Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Mueller, G.M.; Bills, G.F. y Foster, M.S. (Eds.). Pp. 241-270. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Strobel, G.A.; Daisy, B.; Castillo, U. y Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67: 257-268.
- Suryanarayanan, T.S.; Thirunavukkarasu, N.; Govindarajulu, M.B.; Sasse, F.; Jansen, R. y Murali, T.S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23: 9-19.
- Tashjian, A.H. y Armstrong, E.J. (2012). *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. Williams & Wilkins; Philadelphia.
- Thom, E.R.; Popay, A.J.; Waugh, C.D. y Minneé, E.M.K. (2013). Impact of novel endophytes in perennial ryegrass on herbage production and insect pests from pastures under dairy cow grazing in northern New Zealand. *Grass Forage Science*, 69: 191-204.
- Tsonkova, P.; Böhm, C.; Quinkenstein, A. y Freese, D. (2012). Ecological benefits provided by alley cropping systems for production of woody biomass in the temperate region: a review. *Agroforestry Systems*, 85: 133-152.

- Underwood, E.C.; Viers, J.H.; Klausmeyer, K.R.; Cox, R.L. y Shaw, M.R. (2009). Threats and biodiversity in the mediterranean biome. *Diversity and Distributions*, 15: 188-197.
- Unión Europea (2013). Regulation (EU) N° 1305/2013 of the European Parliament and of the council of 17 december 2013 on support for rural development by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) and repealing Council Regulation (EC) No 1698/2005. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:347:0487:0548:en:PDF>
- van Noordwijk, M.; Lawson, G.; Soumare, A.; Groot, F. y Hairiah, K. (1996). Root distribution of trees and crops: competition and/or complementary. En: *Tree-Crop Interaction: A Physiological Approach*. Huxley, P. (Ed.), Pp. 319-364. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van Zanten, B.T.; Verburg, P.H.; Espinosa, M.; Gómez-y-Paloma, S.; Galimberti, G.; Kantelhardt, J.; Kapfer, M.; Lefebvre, M.; Manrique, R.; Piorr, A.; Raggi, M.; Schaller, L.; Targetti, S.; Zasada, I. y Viaggi, D. (2013). European agricultural landscapes, common agricultural policy and ecosystem services: a review. *Agronomy for sustainable development*, 34: 309-325.
- Venugopalan, A. y Srivastava, S. (2015). Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 33: 873-887.
- Verma, V.C.; Kharwar, R.N. y Strobel, G. (2009). Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural product communications*, 4 (11): 1511-1532.
- Wainwright, M. (2008). Some highlights in the history of fungi in medicine - A personal journey. *Fungal biology reviews*, 22: 97-102.
- Wang, Z.; Ma, Z.; Wang, L.; Tang, C.; Hu, Z.; Chou, G. y Li, W. (2015). Active anti-acetylcholinesterase component of secondary metabolites produced by the endophytic fungi of *Huperzia serrata*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 399-405.
- Watkinson, S.C. (2016a). Mutualistic Symbiosis Between Fungi and Autotrophs. En “The Fungi”. Watkinson, S.C.; Boddy, L. y Money, N.P. (eds.) Pp. 141 – 187. Elsevier. Londres.
- Watkinson, S.C. (2016b). Physiology and Adaptation. En “The Fungi”. Watkinson, S.C.; Boddy, L. y Money, N.P. (eds.) Pp. 141 – 187. Elsevier, Londres.
- Wijesekera, K.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S. y Kittakoop, P. (2017). Metabolite diversification by cultivation of the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. in halogen

- containing media: Cultivation of terrestrial fungus in seawater. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (Sin publicar)
- Woudenberg, J.H.C.; Groenewald, J.Z.; Binder, M. y Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171-212.
- Yadav, M.; Yadav, A. y Yadav, J.P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1): 256-261.
- Yang, M.H.; Li, T.X.; Wang, Y.; Liu, R.H.; Luo, J. y Kong, L.Y. (2017). Antimicrobial metabolites from the plant endophytic fungus *Penicillium sp.* *Fitoterapia*, 116: 72-76.
- Young, A. (1997). *Agroforestry for Soil Management*. Pp. 306 C.A.B. International and ICRAF, Wallingford.
- Yu, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zheng, C.; Guo, L.; Li, W.; Sun, P. y Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165: 437-449.
- Zhao, J.; Sun, W.; Shan, T.; Mou, Y.; Lou, J.; Li, Y.; Wang, M. y Zhou, L. (2012). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2100-2104.
- Zhao, J.; Ma, D.; Luo, M.; Wang, W.; Zhao, C.; Zu, Y.; Fu, Y. y Wink, M. (2014). In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Research International*, 56: 243-251.