

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 982**

21 Número de solicitud: 201700680

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.01.2019

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (100.0%)
Otri. Edificio Central Universidad de la Laguna
C/Delgado Barreto s/n
38201 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) ES

72 Inventor/es:

COSOVEANU, Andrea y
CABRERA PEREZ, Raimundo

54 Título: **Hongos endófitos HTF58 Alternaria alternata y HRO8 Fusarium acuminatum de Artemisa thuscula y Artemisa austriaca como antifúngicos de uso agrícola**

57 Resumen:

Hongos endófitos HTF58 Alternaria alternata y HRO8 Fusarium acuminatum de Artemisia thuscula y Artemisia austriaca como antifúngicos de uso agrícola.

Las enfermedades y plagas constituyen un importante problema agrícola. La presente invención propone nuevos productos con actividad biocida obtenidos a partir de hongos endófitos. Más concretamente, la invención se refiere a extractos obtenidos de hongos endófitos de Artemisia spp., que presentan actividad biocida de interés en la agricultura, lo que los convierte en una alternativa a los productos de síntesis química utilizados tradicionalmente. Específicamente, la actividad biocida se ejerce frente a hongos patógenos que afectan a cultivos de gran importancia económica. Estos extractos proceden de fuentes naturales, pueden obtenerse en grandes cantidades mediante cultivo en biorreactores y pueden ser utilizados en la formulación de productos fitosanitarios de manera directa o sometidos a técnicas apropiadas para obtener fracciones/subfracciones/compuestos con actividad definida.

ES 2 696 982 A1

DESCRIPCIÓN

Hongos endófitos HTF58 *Alternaria alternata* y HRO8 *Fusarium acuminatum* de *Artemisia thuscula* y *Artemisia austriaca* como antifúngicos de uso agrícola.

5

Sector de la técnica

La presente invención hace referencia a la obtención de extractos de determinadas cepas fúngicas endófitas de *Artemisia thuscula* (HTF58 *Alternaria alternata*) y de *Artemisia austriaca* (HRO8 *Fusarium acuminatum*) que presentan actividad antifúngica de aplicación agrícola. Por lo tanto, la invención se podría englobar en el campo de la agricultura, más concretamente de la industria agroquímica en el sector de los biocidas que comprenden sustancias producidas o extraídas de microorganismos. En este caso, el uso de los extractos bioactivos obtenidos por el cultivo de dichas cepas fúngicas podría utilizarse como producto(s) fitosanitario(s).

15

Antecedentes de la invención

Los extractos obtenidos de fuentes naturales así como las moléculas aisladas e identificadas a partir de ellos, con actividad biocida, se han convertido en uno de los principales retos en la investigación y desarrollo de nuevas drogas. Estas fuentes naturales proporcionan un mayor campo de acción y una menor toxicidad en comparación con los productos de síntesis y fuentes usados tradicionalmente.

20

Por otro lado, existe también la necesidad de controlar plagas y patógenos agrícolas de una manera respetuosa con el medio ambiente ya que de manera tradicional, la mayoría de los pesticidas provienen de la síntesis química implicando un alto coste económico y ambiental. Actualmente, el interés se ha dirigido, debido a la presión pública y política, hacia el uso de productos respetuosos con la naturaleza en la producción agrícola, incluyendo aquellos provenientes de fuentes naturales.

25

30

En muchos países desarrollados, a pesar de la normativa existente (p.ej.: Protocolo de Montreal en 1987, Convenio de Rotterdam en 2004, Convenio de Estocolmo en 2006, Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de Plaguicidas-Directrices para el desarrollo de políticas de manejo de plagas y plaguicidas, FAO 2010) y sus herramientas (Niveles Máximos de Residuos (NMR), el MIP (Manejo integrado de plagas, con especial énfasis en el control biológico), etc.), todavía existen informes de altas incidencias de contaminación y envenenamiento de los usuarios, trabajadores agrícolas y población general por plaguicidas, por lo que la seguridad alimentaria relacionada con los residuos de plaguicidas es un tema muy preocupante a nivel político y social.

35

40

Además la resistencia a los fitoquímicos tradicionales o su ineficacia frente a determinados patógenos agrícolas está abundantemente documentada como un fenómeno creciente y generalizado (Georghiou, G.P & Saito.T., 1979. Pest resistance to pesticides; Georghiou, 1986. Pesticide resistance, 14-44; Tabashnik & Roushr, 1990. Pesticide resistance in arthropods: 1-3.). Este fenómeno junto con la creciente demanda agrícola mundial ha llevado a una progresiva necesidad de bioplaguicidas efectivos, de origen natural, respetuosos con el medio ambiente y la salud humana y animal.

45

Es urgente la necesidad de encontrar productos fungicidas naturales, teniendo en cuenta la próxima retirada de muchos de los productos de origen químico de síntesis permitidos actualmente por parte de las autoridades responsables (Reglamento (CE) N° 1107/2009, Directiva Europea 2009/128/CE, Ley FIFRA de la EPA de Estados Unidos, Acuerdo de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la OMC, Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas-Directrices para el desarrollo de políticas de manejo de

50

plagas y plaguicidas, FAO 2010). Dentro de este escenario, la búsqueda de compuestos activos alternativos a los de origen químico sintético, eficaces, que reduzcan la aparición de resistencias cruzadas, no presenten efectos tóxicos indeseables y de origen natural, es una buena alternativa.

5 Los endófitos, microorganismos que residen en los espacios intersticiales de las plantas sin causarles daño, son un grupo de organismos relativamente poco estudiados y suponen una fuente potencial de nuevos productos naturales con aplicaciones médicas, agrícolas e industriales. De una manera más concreta, los hongos endófitos establecen una interacción
10 simbiótica con su hospedero que mejora la adaptación ecológica de la planta al ecosistema; aumentando su tolerancia al estrés, a cambios de temperatura y salinidad, resistencia a enfermedades, herbívoros, nematodos, bacterias y hongos (Aly et al. 2010, *Fungal Diversity* 41: 1-16; Swarthout et al., 2009, *Environ. Exp. Bot.* 66, 88-93; X. M. Wang et al., 2015, *J. Basic Microbiol.* 55, 659-670; Coombs et al., 2004, *Biol. Control* 29, 359-366; Jaschke et al., 2010, *Plant Pathol.* 59, 100- 111).

Esta relación simbiótica ha sido confirmada, puesto que las plantas nutren y protegen al hongo y éste produce sustancias bioactivas (antifúngicas, antibacterianas, insecticidas, hormonas de crecimiento, etc.) para incrementar el crecimiento y la competitividad del hospedero (Carroll, 1988, *Ecology* vol.69, nº1, pp. 2-9; Schulz and Boyle, 1998, *Mycol. Res.* 109, 661-686; Clay, 1990, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 275:297). El aumento de la resistencia a plagas y enfermedades ha sido referido en varias interacciones entre plantas hospederas y endófitos (Breen, 1994. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 401-423;; Xiao et al., 2014. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(16), pp. 3584-3590). Muchos endófitos de la misma especie son aislados a
25 menudo de la misma planta y sólo una o pocas cepas producen compuestos con una marcada actividad biológica en cultivo aislado (Li et al. 1996, *Microbiology*, 142, pp. 2223-2226).

Gary A. Strobel (2003, *Microbes and Infection*, 5: 535-544) teorizó que la íntima asociación entre el endófito y su planta hospedera llevaba a la producción de un mayor número y diversidad de moléculas biológicas, comparado con los epífitos o con los microorganismos asociados al suelo. Por otro lado, Alfonsus Alvin, Miller & Neilan (2014, *Microbiological Research*, 169(7-8):483-95), subrayaron que la naturaleza simbiótica de esta relación indica que los compuestos bioactivos del endófito poseen una toxicidad celular reducida ya que estos compuestos químicos no matan a las células eucariotas del hospedero.

35 En consecuencia, los investigadores han centrado sus estudios en el uso de endófitos contra plagas y enfermedades vegetales (B Schulz et al., 2002, *Mycology Research* 106:996-1004), patógenos humanos (Alfonsus Alvin et al., 2014, *Microbiological Research*,169(7-8):483-95) y como fuente de nuevas drogas (Suryanarayanan et al., 2009, *Fungal Biology Reviews*,23,9-19).

40 En algunos casos, las mismas sustancias pueden ser producidas tanto por el endófito como por la planta hospedera (Stierle et al., 1993, *Science* 260 (5105):214-6; Strobel & Hess, 1997, *Chemistry & Biology*, 4; 529-536; Lee at al., 1995, *J. Org. Chem.* 60, 7076-7077; Kusari et al., 2008, *J. Nat. Prod.* 71: 159-162; Kusari et al., 2008, *J. Nat. Prod.* 71, 159-162; Kusari et al., 2012, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1287-1294; Shu et al., 2014, *World J. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s11274-014-1737-6; Na et al., 2016, *Microbiol. Res.* 192, 114-121). No obstante, los costes de producción para la obtención de los compuestos bioactivos son menores en el caso del uso de los microorganismos y los beneficios son mayores (Wang et al., 2014, *Journal of Pure and Applied Microbiology* 8(5), 3729-3738).

50 Como se ha mencionado con anterioridad, uno de los principales ámbitos de aplicación de estas nuevas moléculas provenientes de hongos endófitos es la agricultura, concretamente en el control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos y que tantas pérdidas ocasionan. De las numerosas enfermedades agrícolas existentes, las patologías originadas por

hongos conforman una de las parasitosis más generalizadas a nivel mundial, registrándose altas tasas de infección y mortalidad que ocasionan cuantiosas pérdidas económicas al sector agrícola mundial (Agrios, 2005, Plant Pathology).

- 5 El tratamiento tradicional de enfermedades fúngicas se basa en el uso de fungicidas de síntesis con los ya conocidos problemas de resistencia y contaminación derivados de su uso. Así, de toda la información presentada se desprende la importancia existente en la investigación y búsqueda de potenciales sustancias fungicidas naturales aplicables en la agricultura.
- 10 Dentro del extenso abanico vegetal existente, *Artemisia* destaca por ser un género altamente evaluado para uso médico y agrícola. Una revisión de la bibliografía muestra que este género de planta se encuentra en el punto de mira de los investigadores con más de 11.200 publicaciones en Scopus.
- 15 Hay que tener en cuenta que *Artemisia* es un género cosmopolita y generalmente poco atacado por plagas y enfermedades. Además engloba especies de plantas usadas en medicina tradicional y conocidas por sus diversas propiedades. Estas propiedades podrían deberse parcialmente a la presencia de hongos endófitos activos y a la existencia de productos activos metabolizados tanto por la planta como por los endófitos. Prueba de ellos es que ya han sido
- 20 aislados con anterioridad de *Artemisia* spp. hongos endófitos con actividad biocida (Yixin Qian et al., 2014, *Chiang Mai J. Sci.* 41 (4): 910-921; Liu et al., 2001, *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282; Lu et al., 2000, *Plant Science*, 151: 67-73, Zou et al., 2000, *Plant Science*, 151: 67-73).
- 25 La actividad biológica de los hongos endófitos asociados con *Artemisia* spp. Es abundante como por ejemplo en cepas activas de *A. annua* (Liu et al., 2001, *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282; Li et al. 2009, *Chinese Journal of Natural Medicines* 2009 Vol.7 No.5 pp.354-356 ref.12; J. W. Wang, Zhang, & Tan, 2001, *Biotechnology letters*; H. Zhang, Bai, & Wu, 2012, *Bangladesh J. Pharmacology*; 7: 120-123; J. W. Wang, Zheng, & Tan, 2006, *Chinese Journal of*
- 30 *Biotechnology*, Sep; 22(5):829-34).

En nuestro caso, los hongos endófitos de *Artemisia thuscula* y *Artemisia austriaca* aquí descritos se corresponden con la cepa HTF58 *Alternaria alternata* y HRO8 *Fusarium acuminatum*, respectivamente. Estas cepas de *Alternaria alternata* (HTF58) y *Fusarium acuminatum* (HRO8) como hongos endófitos de *Artemisia* spp. Presentan actividad biocida

35 frente a *Botrytis cinerea*. *Alternaria alternata*, *Alternaria linariae*, *Alternaria solani*, *Alternaria grandis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria dauci*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Colletotrichum lundemuthianum*.

40 *Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno de gran importancia debido a que el principal cultivo al que afecta es la vid (*Vitis vinífera*), uno de los cultivos económicamente más importantes del mundo. Pero *B. cinerea* también afecta a otros tipos de cultivos no menos importantes como frutas blandas (ej. las fresas) o cultivos de flores ornamentales (ej. Las rosas). Estas enfermedades vegetales se previenen y controlan principalmente mediante el uso de semillas

45 sanas (tratamiento de desinfección), variedades resistentes o la aplicación de fungicidas químicos como el tebuconazol, ciprodinil, clortalonil, pirimetanil o metil tiofanato.

Fusarium graminearum, es un hongo fitopatógeno que ataca básicamente a los cereales. Uno de los cultivos más importantes a nivel mundial afectado por este patógeno es el trigo, y su

50 prevención y tratamiento suele basarse en el uso de genotipos resistentes, diversificación del periodo de siembra y la aplicación de fungicidas químicos.

Fusarium culmorum también afecta a los cultivos de cereales (trigo, cebada, arroz, millo, sorgo, etc.) principalmente en campo aunque también en almacén. Por ello se le considera

actualmente una de las grandes plagas en los cultivos de grano, aunque también afecta a cultivos de monocotiledóneas y dicotiledóneas.

5 De manera general en el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. Y otros hongos se utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en este grupo se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. (Agrios, 2005, Plant Pathology).

10 *Colletotrichum lundemuthianum*, es un hongo patógeno que afecta principalmente al cultivo de la judía (frijol, *Phaseolus vulgaris*), provocando la enfermedad conocida como antracnosis o mancha negra. El cultivo del frijol es de gran importancia e interés económico mundial y este fitopatógeno provoca pérdidas cuantiosas. Su control suele basarse en prácticas culturales, uso de semilla certificada y control químico (azoxistrobina, propiconazol, tebuconazol, tiofanato metílico...).

15 *Alternaria* spp. engloba a las principales especies fúngicas responsable de la enfermedad conocida como alternariosis (manchas negras en hojas, tallos, flores y frutos). A modo de ejemplo podemos nombrar algunas de las especies fitopatógenas más destacadas por su importancia agrícola: *A. dauci* (patógeno de la zanahoria), *A. brassicicola* (patógeno de crucíferas), *A. alternata* (patógeno de más de 300 especies vegetales), *A. solani*, *A. grandis* y
20 *A. linariae* (patógenos de solanáceas). Las enfermedades causadas por *Alternaria* spp. se controlan principalmente mediante el uso de variedades resistentes, de semillas tratadas o libres de enfermedad y a través de aspersiones químicas con fungicidas tales como el clorotalonil, maneb, captafol, mancozeb y el hidróxido de fentina (Agrios, 2005, Plant Pathology).

25 Contrariamente, *Alternaria alternata* como endófito de varias plantas hospederas, es conocido por producir novedosas moléculas bioactivas como por ejemplo: derivados de altenueno, isocumarina y otros metabolitos (planta hospedera: *Camellia sinensis*) (Ying Wang, Yang, Wang, Li, & Kong, 2014. *Fitoterapia*, Dec.; 99:153-8); diketopiperazinas, inhibidoras efectivas de *Plasmopara vitícola* (planta hospedera: *Vitis vinífera*) (Musetti et al., 2007, *Micron* 38, 643-650), alternariol, alternariol monometileter, 5-epi-altenueno, altenueno, uridina, adenosina, ACTG toxina-E, ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-ona y ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (planta hospedera: *Maytenus hookeri*) (Ma. Qiao, Quan-Shi, Zhang, & Gao, *Chem. Nat. Compd.* (2010) 46: 504). *Alternaria alternata* también ha sido encontrado como endófito con diversa actividad biocida en
30 varias especies del género *Artemisia*: *A. lavandulifolia*, *A. argyi*, *A. brachyloba*, *A. scoparia*, *A. subulata* y *A. tangutica* (Cosoveanu et al., 2016, *Mycosphere* 7 (2): 102-117).

40 *Fusarium acuminatum* como fitopatógeno, puede provocar graves pérdidas en determinados cultivos (girasol, guandú, etc.). Sin embargo, varias especies del género *Fusarium* spp. han sido localizadas como hongos endófitos de distintas plantas hospederas y se han obtenido compuestos con actividad biocida muy significativa, como por ejemplo: paclitaxel (taxol) (Li C-T et al., 2008, *Journal of Medical Biochemistry*, 27: 454-458; Chakravarthi et al., *Journal of Biosciences*. 2008; 33: 259- 267; Deng et al., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009; 25: 139-143), podofilotoxina (Kour et al., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24: 1115-1121), camptotecina (Shweta et al., *Phytochemistry*. 2010; 71: 117-122), vinblastina y vincristina (Zhao et al., 2010, In: *Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A-Mendez Vilas (Ed), 567-576). Además, *Fusarium* spp., han sido encontrados como endófitos de especies del género *Artemisia*, como por ejemplo: *A. argyi* (Qian et al., *Chiang Mai J. Sci.* 2014; 41(4): 910-921), *A. annua* (Yuan et al., 2011, *Plant Biosystems*, Vol.145, Iss. 2; Zhang et al., 2012, *Bangladesh J Pharmacology*; 7: 120-123) y *A. nilagirica* (Myrchiang et al., 2014, *JAdv.Lab.Res.Biol.* 5: 112- 119), con distintas propiedades bioactivas.

A pesar de todas estas investigaciones mencionadas previamente, es de gran importancia destacar que ninguna de estas dos especies de *Alternaria alternata* y *Fusarium acuminatum* han sido encontradas previamente como endófitos de las especies hospederas *Artemisia thuscula* y *Artemisia austríaca*, respectivamente.

5 En la presente invención se pone de manifiesto la actividad biocida de extractos obtenidos de determinadas cepas de hongos endófitos de *Artemisia thuscula* (Cepa HTF58 *Alternaria alternata*) y *Artemisia austríaca* (Cepa HRO8 *Fusarium acuminatum*). Concretamente, se describe una considerable actividad antifúngica de aplicación en el sector agrícola frente a
10 varios fitopatógenos de importancia económica.

Explicación de la invención

15 La cuestión técnica que trata la presente invención es la búsqueda de nuevos productos naturales, provenientes de extractos obtenidos del cultivo de hongos endófitos, y que por su actividad biocida pueden ser utilizados en el control de fitopatógenos, especialmente de hongos, de una manera efectiva y respetuosa con el medio ambiente, como alternativa al uso de biocidas químicos de síntesis.

20 En la presente invención se describe la obtención y el uso de extractos bioactivos de hongos endófitos aislados de plantas de las especies *Artemisia thuscula* y *Artemisia austríaca* como antifúngicos frente a patógenos de plantas de interés agrícola con capacidad potencial para ser desarrollados como productos fitosanitarios comerciales. En la presente invención se pone de manifiesto que, los extractos bioactivos de estas dos especies hongos endófitos de *Artemisia*
25 spp. mostraron una considerable actividad biocida.

Los hongos endófitos aquí descritos, HTF58 *Alternaria alternata* y HRO8 *Fusarium acuminatum* fueron obtenidos a partir de los tallos de *Artemisia thuscula* y *Artemisia austríaca*, respectivamente. El material vegetal del que se obtuvieron las muestras fue analizado "in situ",
30 siendo seleccionadas exclusivamente aquellas plantas que no presentaran ningún signo de enfermedad o ataque de plaga. Más concretamente, la muestra de *A. thuscula*, de la que se obtuvo la cepa HTF58 *Alternaria alternata* de la presente invención, fue recolectada en Tenerife (Mesa Mota, San Cristóbal de La Laguna) y la muestra de *A. austríaca*, de la que se obtuvo la cepa HRO8 *Fusarium acuminatum* descrita en la presente invención, fue recolectada en
35 Rumanía, concretamente en Corbu.

Los tallos fueron cortados, etiquetados y guardados en bolsas de cierre zip dentro de bolsas de papel y mantenidas a una temperatura de 4-5 °C hasta llegar al laboratorio y procesados dentro
40 de las primeras 24 horas de su llegada. Estos tallos fueron esterilizados superficialmente para eliminar cualquier organismo epífito: primero fueron lavados con agua esterilizada, después sumergidos en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de una inmersión en hipoclorito sódico al 15% durante 1 minuto, de nuevo en etanol al 70% durante 1 minuto y finalmente lavados con agua destilada esterilizada. Después de este proceso, el material vegetal fue secado en una hoja de papel de filtro estéril, escindidos con un escalpelo estéril en fragmentos de 2 cm y éstos
45 finalmente cortados longitudinalmente. La sección longitudinal de estos segmentos correspondiente al interior de la planta, se colocó en contacto con el medio nutritivo de dextrosa - agar (PDA) en placas Petri e incubados a 25 °C en la oscuridad durante 2 semanas con observación diaria.

50 Cada colonia emergida de estos segmentos fue posteriormente aislada e identificada, por su morfología. Esta identificación fue finalmente confirmada mediante los análisis de identificación molecular de las cepas en base a la amplificación y secuenciación de la región ITS ribosomal del ADNr extraído de una muestra de micelio (White et al. 1990, In: PCR-Protocols and Applications - A Laboratory Manual, pp.315-322).

Una vez aislado el hongo, se procedió a un experimento preliminar para averiguar el potencial como antagonista de hongos fitopatógenos. Como consecuencia de la actividad antagónica presentada, se decidió realizar un extracto del cultivo puro con el fin de evaluar su potencial fungicida. El extracto fue obtenido tras el cultivo del hongo endófito en arroz durante tres semanas mediante el siguiente proceso conocido: se vertieron 200 ml de acetato de etilo sobre granos de arroz cubiertos con micelio, se sellaron y se dejaron reposar durante 24 horas. En el caso de *Fusarium acuminatum*, se realizaron varias extracciones en acetato de etilo, metanol y etanol, mostrando mejor bioactividad en esta última.

Por extracto se entiende el resultado del cultivo obtenido tras el crecimiento y desarrollo del hongo endófito sobre el medio de cultivo, (orgánico y/o sintético) que engloba a todos los compuestos de la invención y que puede ser un extracto seco obtenido por extracción con solvente orgánico previa filtración, o un liofilizado. El producto de la invención es el producto crudo obtenido del cultivo del hongo pero también cualquier fracción o subfracción sucesiva obtenida a partir de dicho producto inicial y que se obtiene por las técnicas de fraccionamiento recogidas en la descripción.

En nuestro caso, el producto obtenido del cultivo fue retirado del medio y filtrado a través de papel de filtro (Whatman N° 1) mediante vacío usando un embudo Buchner. La extracción se repitió tres veces. El solvente fue retirado por evaporación al vacío, usando un Buchi® Vacuum Controller V-800 (350-100 mbar, a T=50 °C). El extracto fue finalmente secado en un desecador con sílica gel naranja (Sigma-Aldrich). Una vez seco, el extracto fue pesado y mantenido a una temperatura de 5 °C.

El aislamiento de los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención partiendo del producto se realiza por técnicas de fraccionamiento conocidas por cualquier experto en el estado de la técnica. Aquellas utilizadas en el ámbito de la invención han sido, por ejemplo y sin limitarse: cromatografía líquida de vacío (VLC), cromatografía en columna (CC), cromatografía preparativa de capa fina (PTLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), eluyéndose con distintos gradientes de polaridad mediante diferentes combinaciones de disolventes orgánicos.

Es necesario aclarar que el producto de cultivo de la invención se refiere al producto crudo que se obtiene tras el cultivo del micelio del hongo endófito con capacidad para producir los compuestos de la invención en un medio de cultivo, pero también cualquier fracción o subfracción sucesiva obtenida a partir de dicho producto inicial y que se obtiene por cualquiera de las técnicas de fraccionamiento recogidas anteriormente.

Como el experto en la materia conocerá es posible obtener distintas fracciones a partir del extracto crudo, cada una de las cuales comprende una composición distinta de compuestos bioactivos, y que a su vez pueden volver a subfraccionarse en repetidas ocasiones hasta que la subfracción esté constituida por una mezcla simple y/o un único compuesto bioactivo. Esta actividad biocida de los extractos de la invención no se explica exclusivamente por la actividad de una molécula concreta. Los fraccionamientos químicos realizados por los inventores, la determinación de compuestos bioactivos y los ensayos de actividad biocida, permiten identificar la actividad de otros compuestos que podrían actuar de forma sinérgica.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentran no sólo todas las moléculas componentes del extracto de cada hongo endófito, sino todos sus estereoisómeros y las mezclas de los mismos (diastereómeros, racémicos, etc.), así como sales y solvatos aceptables de todos los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención o de cualquier otro compuesto que, cuando se aplica a un patógeno vegetal, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) la actividad biocida descrita en el presente documento. Los compuestos que se incluyen en el ámbito de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres

o como solvatos. Los métodos de solvatación son de conocimiento general dentro de la técnica.

5 Por actividad biocida en la presente invención, se entiende la capacidad de controlar al menos un patógeno que afecte a plantas a través de diferentes mecanismos de acción. En la presente invención se incluyen como ejemplos de patógenos aunque sin limitarse: hongos fitopatógenos. Esta capacidad antifúngica fue evaluada y contrastada utilizando ensayos específicos de inhibición del crecimiento del micelio del hongo patógeno en placas con medio sólido y líquido.

10 Hay que destacar que se realizaron varios extractos provenientes de distintos cultivos de los hongos endófitos aquí tratados (HTF58 y HRO8) que demostraron mantener su actividad fungicida. De este hecho se desprende el alto grado de estabilidad de las cepas y su alto poder biocida.

15 Los extractos crudos de ambos endófitos fueron sometidos a procesos de fraccionamiento, nombrados con anterioridad, para comprobar su eficacia frente a varios patógenos así como para intentar aislar e identificar las moléculas responsables de esta actividad biocida. Las fracciones obtenidas para cada uno de los endófitos y su actividad biocida aquí descritas fueron las siguientes:

20 • Fracciones del hongo endófito HTF58 *Alternaria alternata*, obtenido de *A. thuscula*: de la biomasa del cultivo de este endófito se obtuvo un extracto con acetato de etilo, denominado HTF58_1, cuyo efecto fue probado sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*, con un valor de %I= 89,88 (4.71) a 0.5 mg/ml.

25 En la primera fase de fraccionamiento de este extracto, la fracción metanólica obtenida por cromatografía en columna mediante vacío (VLC), denominada HTF58_F1, presentó una inhibición relevante al crecimiento de *Botrytis cinerea* (%I = 96.49, a 0.1 mg/ml).

30 Se realizaron subsecuentes fraccionamientos incrementando la polaridad con las fracciones. El proceso fue guiado por los resultados obtenidos en los bioensayos y en la cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y se obtuvo la subfracción final denominadas HTF58_1_F1F1_A. Todas estas subfracciones inhibieron excepcionalmente el crecimiento de *Botrytis cinerea* (véase "Realización preferente de la invención", Tabla 5).

35 • Fracciones del hongo endófito HRO8 *Fusarium acuminatum*, obtenido de *A. austríaca*: Se obtuvo un extracto metanólico a partir de su biomasa inicial, denominado extracto 2 (HRO8_2). Este extracto fue probado frente a *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria linariae*, *Alternaria grandis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria dauci*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Colletorichum lundemuthiamun*. De todos estos patógenos, *Alternaria alternata* fue la más sensible a los compuestos activos de este extracto, con una inhibición del crecimiento de 63,04% a 0,5 mg/ml. Este extracto también mostró actividad relevante frente a los demás patógenos previamente mencionados. Los resultados concretos pueden consultarse en el apartado siguiente (véase Realización preferente de la invención, Tabla 6).

45 De este extracto HRO8_2, se obtuvieron varias fracciones guiadas en función de los resultados obtenidos en los bioensayos utilizando distintos sistemas de elución incrementando la polaridad con las fracciones La fracción más activa frente a los fitopatógenos expuestos previamente fue la fracción obtenida con el etil acetato: metanol (90:10), denominada HRO8_2_F1 (véase el apartado siguiente "Realización preferente de la invención", Tabla 7-9).

50 Los siguientes fraccionamientos que se realizaron a partir de esta fracción F1R08_2_F1 dieron como resultado la subfracción HRO8_2_F1F1 muy activa frente a *A. alternata* (%I= 40.23 (11.14), a 0.05 mg/ml).

Finalmente, con la intención de ofrecer una visión comparativa de la eficacia de las fracciones de los extractos de los hongos endófitos aquí descritos, en contraposición a la de los productos químicos de síntesis usados tradicionalmente frente a hongos patógenos; se realizó un experimento de inhibición de crecimiento con el Clotrimazol (fungicida de uso médico). Los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y *A. alternata* relativos al uso de los extractos HTF58_1 y HRO8_2 de las cepas de la invención frente al Clotrimazol, se presentan a continuación en la

Tabla 1.

Tabla 1. Comparativa del porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno en función del producto aplicado a 0.5mg/ml.

<i>Patógeno</i>	<i>[0.5 mg/ml] Extracto HTF58_1/Clotrimazol</i>	<i>[0.5 mg/ml] Extracto HRO8_2/Clotrimazol</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	89.88 (4.71)/99.92(3.50)	---
<i>Alternaria alternata</i>	---	73.03(1.25)/92.43(2.65)

Es importante aclarar que no todos los hongos de los géneros *Alternaria* y *Fusarium* presentan la capacidad de producir los compuestos de la invención. Aunque es la interacción endófito planta hospedera la que confiere al hongo unas características determinadas que posibilitan la producción de determinados compuestos, luego estos hongos son capaces de continuar produciéndolos al ser cultivados de manera aislada en laboratorio. Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención no sólo proporciona los productos obtenidos del cultivo de ambas cepas sino también los diferentes compuestos que dan lugar a la actividad biocida.

Por este motivo, en la presente invención, por hongo del género *Alternaria* y del género *Fusarium* con capacidad para producir los compuestos de la invención, se entiende cualquier cepa de estos géneros que debido a su interacción con la planta hospedera ha desarrollado las características necesarias para producir los productos del cultivo/extractos/compuestos de la invención. Preferentemente la cepa HTF58 de *Alternaria alternata* y la cepa HRO8 de *Fusarium acuminatum*, aisladas de los tallos de *Artemisia thuscula* y *Artemisia austriaca*, respectivamente, depositadas con fecha 23/03/2017 en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de depósito CECT20971 y CECT20972 siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, o mutantes de las mismas que mantengan la capacidad biocida aquí descrita.

Por el término mutante, se entiende un hongo que se obtiene a partir de las correspondientes cepas con número de depósito CECT20971 y CECT20972 de la invención y que se caracteriza por mantener la capacidad biocida aquí referida. Un mutante se entiende como una "variante" del microorganismo inicial u original. El experto en la materia entenderá que los mutantes que retienen las características y ventajas de las cepas de la invención se pueden obtener de manera rutinaria, por ejemplo por mutagénesis espontánea o mutación dirigida, usando las cepas de la invención como material de partida.

Las principales ventajas técnicas de estos productos de cultivo, extractos, fracciones, subfracciones y/o compuestos, incluidos dentro del ámbito de la invención se enumeran a continuación:

- provienen de fuentes naturales, y pueden obtenerse por procedimientos sencillos y económicos.
- 5 - se pueden obtener a gran escala por cultivo del microorganismo en biorreactores y las condiciones del cultivo pueden manipularse para aumentar la producción de los componentes activos.
- son singularmente efectivos contra hongos en comparación con productos de síntesis química (véase Tabla 1).
- 10 - Los extractos crudos pueden ser usados directamente en la formulación de compuestos fitosanitarios o pueden ser purificados por métodos apropiados y obtener fracciones con actividad biológica definida y/o compuestos concretos con actividad biocida específica.

15 **Realización preferente de la invención**

La presente invención se describe detalladamente a partir de los ejemplos presentados a continuación, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance:

20 **Ejemplo 1- Obtención e identificación de los hongos endófitos**

Los hongos incluidos en la presente invención fueron obtenidos de tallos de *Artemisia* spp. recolectados en distintas partes del mundo. Concretamente, HTF58 *Alternaria alternata* fue obtenida a partir de muestras de tallo de *Artemisia thuscula* recolectada en Tenerife (Mesa Mota), mientras que HRO8 *Fusarium acuminatum* fue obtenida a partir de tallos de *Artemisia austriaca* recolectada en Rumania (Corbu).

El material vegetal fresco, seleccionado por carecer de signos de enfermedad y/o ataque de plaga, se esterilizó superficialmente con agua esterilizada, después sumergidos en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de una inmersión en hipoclorito sódico al 15% durante 1 minuto, de nuevo en etanol al 70% durante 1 minuto y finalmente lavados con agua destilada esterilizada. Después de este proceso, el material vegetal fue secado en una hoja de papel de filtro estéril, escindidos con un escalpelo estéril en fragmentos de 2 cm y éstos finalmente cortados longitudinalmente. La sección longitudinal de estos segmentos correspondiente al interior de la planta, se colocó en contacto con el medio nutritivo de dextrosa- agar (PDA) en Placa Petri e incubados a 25 °C en la oscuridad durante 2 semanas con observación diaria.

El cultivo puro se obtuvo aislando individualmente una colonia y replicándola periódicamente para su mantenimiento. Se realizaron preparaciones microscópicas con una solución de metileno, siguiendo los protocolos conocidos por cualquier experto en la materia, con el fin de observar sus características morfológicas (hifas, conidios y conidióforos).

Los hongos se identificaron a nivel molecular en base a la amplificación y secuenciación de la región ITS ribosomal del ADNr extraído de una muestra de micelio (White et al. 1990, In: PCR-Protocols and Applications - A Laboratory Manual, pp.315- 322). Los hongos se identificaron como *A. alternata* y *F.acuminatum* por comparación de la secuencia ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr con las depositadas en la página web de búsqueda BLASTN usando el programa Megablast provisto por el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

50 **Ejemplo 2- Cultivo y extracción**

El proceso que se detalla a continuación se realizó para cada una de las cepas objeto de la invención.

El cultivo se realizó en placas de Petri con medio de cultivo PDA, a una temperatura constante de 25 °C, durante 4-7 días para HRO8 *F. acuminatum* y 7-10 días para HTF58 *A. alternata*.

- 5 Se preparó un medio de arroz mezclando en matraces Erlenmeyer de 500 ml, 120 g de arroz y 30 ml de agua, se cubrió con algodón y papel de aluminio y se sometió a autoclave (T= 121 °C, 2 min). Los matraces se inocularon con 3 - 5 discos de micelio para cada uno de los hongos endófitos descritos en la presente invención, se sellaron e incubaron (T = 25 C, oscuridad) durante tres semanas. Posteriormente, se vertieron 200 ml de acetato de etilo sobre los granos de arroz cubiertos con micelio, se sellaron y se dejaron reposar durante 24 horas. En el caso del hongo endófito HRO8 (*Fusarium acuminatum*) se observó una mayor inhibición del crecimiento del patógeno en etanol (EtOH) en comparación con acetato de etilo (EtOAc) A posteriori se usó metanol (MeOH) para observar si se mantenía el incremento de la actividad inhibitoria
- 10
- 15 El producto obtenido del cultivo fue retirado del medio y filtrado a través de papel de filtro (Whatman N° 1) mediante vacío usando un embudo Buchner. La extracción se repitió tres veces. El solvente fue retirado por evaporación al vacío, usando un Buchi® Vacuum Controller V-800 (350-100 mbar. a T=50 °C). El extracto fue finalmente secado en un desecador con silica gel naranja (Sigma-Aldrich). Una vez seco, el extracto fue pesado y mantenido a una temperatura de 5 °C. Todos los disolventes utilizados eran de calidad analítica.
- 20

- Como hemos descrito anteriormente, los componentes de la biomasa de cultivo de la cepa HTF58 (*Alternaria alternata*) se solubilizó en acetato de etilo para obtener el extracto 1 (HTF58_1), activo frente *Botrytis cinerea*. Mientras que en el caso de la cepa HRO8 (*Fusarium acuminatum*) se extrajeron con metanol para obtener el extracto 2 (HRO8_2), activo frente a varias especies del género *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Colletotrichum lundemuthianum*.
- 25

Ejemplo 3- Aislamiento y caracterización de los compuestos con actividad biocida

- 30 3.1) Aislamiento de los compuestos con actividad biocida del extracto de HTF58_1 *Alternaria alternata* y HRO8_2 *Fusarium acuminatum*

- Con cada uno de los extractos crudos secos obtenidos de ambas cepas endófitas según el ejemplo anterior, se realizó un primer fraccionamiento mediante cromatografía líquida de vacío (VLC), usando como eluyente mezclas crecientes en polaridad de n-hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol dando lugar a varias fracciones para cada cepa. De estas fracciones se continuó sucesivamente fraccionando aquella que presentó mejores resultados en los bioensayos para cada una de las cepas descritas, usando diferentes técnicas como por ejemplo la cromatografía en columna (CC), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y/o la cromatografía preparativa de capa fina (PTLC).
- 35
- 40

- En el caso del endófito HTF58 *Alternaria alternata*, la fracción más activa obtenida del extracto HTF58_1 frente a *Botrytis cinerea* fue la HTF58_1_F1 (obtenida con metanol), obteniéndose relevantes resultados (%I = 96.49, a 0.1 mg/ml).
- 45

- Como hemos mencionado anteriormente, se llevaron a cabo posteriores fraccionamientos en base a los resultados obtenidos en los bioensayos y la cromatografía de capa fina (TLC) y se obtuvo la subfracción final denominada HTF58_1_F1F1_A. Esta subfracción inhibió notablemente el crecimiento de *Botrytis cinerea* (véase Tabla 5). Los compuestos mayoritarios de esta subfracción fueron analizados y los resultados obtenidos pueden consultarse en el siguiente apartado 3.2.
- 50

Para la cepa HRO8 de *Fusarium acuminatum*, el extracto metanólico 2 (HRO8_2) fue posteriormente fraccionado. Concretamente la fracción más activa del extracto HRO8_2, fue la

F1 (HRO8_2_F1). Esta fracción, eluida con acetato de etilo/metanol (9:1), se ensayó contra varias cepas patógenas de *Alternaria solani*, *Alternaria grandis*, *Alternaria linariae*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria dauci*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Colletotrichum lundemuthianum*.

5 Un fraccionamiento adicional de HRO8_2_F1 produjo una subfracción activa contra *Alternaria alternata*, HRO8_2_F1 F1. Esta subfracción se separó posteriormente a través de HPLC (las fases móviles fueron miliQ agua -A y metanol-B, la separación se alcanzó a un caudal de 0,5 ml/min con un gradiente de 99% B a 100% B durante 30 minutos) y produjo dos subfracciones más, HRO8_2_F1F1_A y HRO8_2_F1F1_B.

10 Esta última aumentó ligeramente su actividad (% I = 58,74 mg/ml, a 0,05 mg/ml) cuando se comparó con la subfracción inicial (% I = 40,23 mg/ml). La subfracción HRO8_2_F1F1 fue analizada mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente apartado (véase Tabla 5).

3.2) Caracterización de los compuestos con actividad biocida de HTF58 *Alternaria alternata* y HRO8 *Fusarium acuminatum*.

20 Técnicas experimentales usadas

A parte de las técnicas cromatográficas mencionadas con anterioridad, en el caso concreto de la caracterización de los compuestos con actividad biocida procedentes de los extractos aquí descritos, fue utilizada la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) conjuntamente con la librería NIST, para identificar compuestos comparando los espectros de masas y los tiempos de retención. Las áreas de pico relativas (RAs) de los metabolitos individuales se expresan en relación al área del pico total de los metabolitos identificados. Basándose en la resolución pico, sus áreas se calcularon a partir de la corriente iónica total. Las áreas de los picos resultantes se expresaron en unidades arbitrarias (u. a.) de área.

30 El análisis se llevó a cabo en GC-MS (Agilent Technologies 6890N) utilizando el software MassLynx 4.1 (Waters). Para ello, se disolvieron 1 mg de muestra en 1 ml de diclorometano de grado analítico (Sigma-Aldrich). Se utilizó una columna SLBTM – 5 ms (30 m x 320 µm x 0,25 µm, Supelco, Sigma-Aldrich) con helio como gas portador, a un caudal de 1 ml/min con presión a 11,654 psi. Las condiciones usadas fueron: Split (50:1), temperatura del horno de GC a T=120 °C durante 2 min y programada a 5 °C/min a 130 °C durante 1 min; 5 °C/min a 150 °C durante 2 min; 2 °C/min a 180 °C durante 3 min; 2 °C/min a 200 °C durante 3 min; 5 °C/min a 240 °C durante 20 min (Chowdhary y Kaushik, 2015).

40 Moléculas identificadas

45 La subfracción HTF58_1_F1F1_A fue la más activa del extracto HTF58_1 de la cepa HTF58 de *Alternaria alternata* frente al fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Adicionalmente, se analizó esta subfracción mediante Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cuyos resultados se presentan a continuación.

Tabla 2. Identificación de los compuestos de la subfracción HTF58_1_F1F1_A

Muestra	Compuesto	m/z	TR	AR%
	2-Trifluoroacetoxitridecane	296	7.34	1.50
	Phenol,2,4-bis[1,1 -dimethylethyl)	206	10.09	4.32
	1-Nonadecene	266	12.47	1.86

HTF58_F1F1	1-Hexadecanol	242	19.92	1.24
	3,6,6-Trimethylundecane-2,5,10-trione	240	28.31	46.73
	Cyclopropane, 1-(1-hydroxy-1-heptyl)-2-methylene-3-pentyl-	240	52.12	10.77
	Compuestos no identificados con AR > 0.9%			25.96
	Compuestos no identificados con AR < 0.9%			7.60
HTF58_F1F1_A	3,6,6-Trimethylundecane-2,5,10-trione	240	28.30	23.16
	Cyclopropane, 1-(1-hydroxy-1-heptyl)-2-methylene-3-pentyl-	240	52.11	7.74
	Compuestos no identificados con AR > 0.9%			49.52
	Compuestos no identificados con AR < 0.9%			19.58

m/z: masa/n° carga; TR tiempo de retención, AP %: porcentaje de área de pico

5 Los compuestos más abundantes se identificaron como 3,6,6-trimetilundecano-2,5,10 triona (AR%=46,73) y ciclopropano, 1- (1 -hidroxi-1 -heptil) -2-metileno-3 pentil (con AR%=10,77).

10 Esta subfracción se purificó adicionalmente pero no se obtuvo ninguna separación de los dos compuestos mayoritarios. Se desconoce si la actividad de esta fracción (%I=96,98 frente a Botrytis cinerea a 0,1 mg/ml) es producida por uno solo de estos compuestos o por ambos.

Los compuestos obtenidos por GC-MS de la subfracción HRO8_2_F1 F1 del extracto HRO8_2 de la cepa HRO8 de Fusarium acuminatum se presentan a continuación:

15 Tabla 3. Identificación de los compuestos de la subfracción HRO8_2_F1F1 del extracto HRO8_2 de la cepa HRO8 Fusarium acuminatum

Muestra	Compuesto	m/z	TR	%AR
HRO8_F1F1	7-Methyl-3-octyne	124	4.47	3.11
	Decanoic acid, 3-hidroxy-, methyl ester	202	6.11	2.04
	Butanamide, 2-hydroxy-N,2,3,3-tetramethyl-	159	7.59	36.75
	L-Lyxose	150	8.15	2.34
	Bicyclo [2. 2. 2] octane, 1,2, 3, 6-tetramethyl	166	11.23	4.41
	3- Methyl- 1, 4- diazabicyclo [4 3.0] nonan 2, 5 dione, N-acetyl	210	16.33	2.60
	d-Alanyl-leucine	202	16.90	0.81
	(3S,6S)-3-Butyl-6-methylpiperazine-2,5-dione	184	17.15	1.21

	Pyrrolo [1, 2 -ajpyrazine- 1, 4 -dione, hexahydro - 3-(2-methylpropyl)-, (3S,8aS)-	210	24.25	4.65
	1 H-indole-3-acetamide	174	31.75	1.87
	Compuestos no identificados con AR > 0.9%			28.40
	Compuestos no identificados con AR < 0.9%			11.80

m/z: masa/n° carga. TR tiempo de retención. AP % porcentaje de área de pico

5 El pico principal se identificó como butanamida, 2-hidroxi-N, 2,3,3-tetrametil (TR = 36,75%). Otros dos compuestos bicyclo [2. 2. 2] octano, 1, 2, 3, 6 tetrametilo y alcaloide pirrólo [1,2 - a] pirazina - 1,4 - diona, hexahidro - 3- (2 - metilpropil) - (3S, 8aS), también se identificaron con abundancia relativa (AR) de 4,41% y 4,65, respectivamente (Tabla 3).

10 La purificación adicional de esta subfracción proporcionó dos subfracciones adicionales que contenían bicyclo [2. 2. 2] octano, 1, 2, 3, 6-tetrametilo con un 13,68% de AR en la primera subfracción (HRO8_2_F1F1_A) y butanamida, 2-hidroxi-N, 2,3,3- tetrametil- con un 80,11% de AR en la segunda subfracción (HRO8_2_F1F1_B).

15 Ejemplo 4- Actividad biocida, bioensayos y resultados

4.1) Actividad antifúngica mediante ensayos de dilución en agar

20 Se realizaron ensayos de actividad antifúngica frente a una serie de hongos fitopatógenos seleccionados en base a sus diferentes interacciones con el hospedador y su importancia económica. Todos los datos y características de las cepas se detallan a continuación.

Tabla 4. Patógenos utilizados para pruebas de actividad antifúngica

Especies Patógenas	Cepa	Hospedero	Institución
Alternaria alternata	Aa 100	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Universidad de La Laguna, Tenerife
Alternaria dauci	A2	<i>Daucus carota</i>	Université d'Angers, France
Alternaria brassicicola	Abra 4 3	<i>Raphanus sativus</i>	Université d'Angers, France
Alternaria brassicicola mutants	AbHog, AbNik, AbSch 9.4, AP1.1		Université d'Angers, France

Alternaría solani	AS10, AS108, AS14, AS15, AS17, AS20, AS25, AS26, AS35, AS45, AS5, AS65, AS67, AS68. AS72, AS83.	<i>Solanum tuberosum</i>	École Nationale Supérieure Agronomique, Alger
Alternaría solani	AS123, AS129, AS130, AS131, AS132, AS133, AS135, AS 136, AS137, AS142, AS143, AS62	<i>Lycopersicon esculentum</i>	École Nationale Supérieure Agronomique, Alger
Alternaría grandis	AG38, AG52, AG54, AG55, AG60	<i>Solanum tuberosum</i>	École Nationale Supérieure Agronomique, Alger
Alternaría grandis	AG152, AG99	<i>Lycopersicon esculentum</i>	École Nationale Supérieure Agronomique, Alger
Alternaría linariae	AT2, AT39, AT57, AT6	<i>Solanum tuberosum</i>	École Nationale Supérieure Agronomique, Alger
Alternaría linariae	AT149, AT40	<i>Lycopersicon esculentum</i>	École Nationale Supérieure Agronomique, Alger
Fusarium graminearum	04-14-02-01		Université d'Angers, France
Fusarium culmorum	04-14-01-01		Université d'Angers, France
Colletotrichum lundemuthianum	04-03-01-05-03		Université d'Angers, France
Botrytis cinerea	B05. 10	<i>Vitis vinifera</i>	Universidad de La Laguna, Tenerife

Para su mantenimiento las cepas patógenas se cultivaron en medio PDA a 25 °C, en oscuridad. Para determinar la actividad fungicida de los extractos aquí descritos frente a estos patógenos, se realizó el siguiente experimento:

Extractos de hongos endófitos como alimento tóxico para patógenos: aquí se engloban los ensayos que evalúan el potencial inhibitorio de los metabolitos de hongos endófitos contra el crecimiento de patógenos fúngicos. Los métodos utilizados para obtener resultados cuantitativos fueron "dilución en agar" y "dilución en medio líquido".

5 Para determinar la actividad biológica de los extractos de hongos endófitos (denominados también EFE) sobre el crecimiento de micelios, se realizaron ensayos usando el método de dilución biométrica en agar en placas de Petri de 90 mm. Los extractos se incorporaron a 1, 0,5 y 0,1 mg/ml (disminuyendo la dosis para los casos de alta actividad). El porcentaje final de etanol en el medio se ajustó a una concentración del 1% (v/v).

10 Para el método de dilución en agar se cultivaron patógenos fúngicos en placas con medio PDA y en presencia del extracto/fracción/subfracción del endófito durante 2- 7 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento específica (*Botrytis cinerea*-48 horas, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Colletotrichum lundemuthianum*-72 horas). Cada patógeno fue inoculado en medio PDA con 8 discos de inóculo de los hongos endófitos a las concentraciones anteriormente definidas, situados en puntos equidistantes de la placa de Petri, usando sólo las periferias de la colonia como inóculo. Como control negativo se utilizaron placas con medio nutritivo y etanol, y el extracto de arroz (metanólico y con acetil acetato), y se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

20 Después de la incubación a 25 °C, en la oscuridad, para cada extracto y concentración, se calculó la inhibición del crecimiento radial (%) en comparación con el control. El crecimiento radial se midió con un software de procesamiento de imágenes Image J - Wayne Rasband (NIH). Se utilizó el modelo de regresión Log-dose Probit para obtener la concentración del producto que reduce el crecimiento micelial en un 50% (IC₅₀) donde se observó la respuesta dosis-efecto. Todos los análisis se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics 21.0.

25 - Resultados del extracto, fracciones y subfracciones de la cepa HTF58 sobre la inhibición de crecimiento de *B. cinerea*:

Los resultados obtenidos se presentan a modo de resumen en la siguiente tabla.

35 Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por parte del extracto HTF58_1 la fracción HTF58_1_F1, la subfracción HTF58_1 _F1F1 y la subfracción HTF58_1 _F1F1_A

mg/ml	HTF58_1	HTF58_F1	HTF58_F1F1	HTF54_F1F1_A
0.1	77 .24 (3.56)	96.49 (1.46)	89 .83 (2.86)	96.98 (4.16)

40 - Resultados del extracto HRO8_2 sobre la inhibición de crecimiento de *Alternaria* sp; *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Colletotrichum lundemuthianum*:

El extracto metanólico HRO8_2 fue probado inicialmente frente a la batería de patógenos mencionados, a distintas concentraciones, obteniéndose los siguientes resultados.

45 Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos por parte del extracto HRO8_2

mg/ml	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria linariae</i>	<i>Alternaria solani</i>	<i>Alternaria grandis</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Alternaria dauci</i>
0.5	63 .0 4 (1.92)	49 82 (7.42)	48.59 (6 72)	53.24 (1 44)	9 2 (1 1.3 1)	50 .5 (30.4)

Tabla 6 (continuación). Porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos por parte del extracto HRO8_2.

mg/ml	<i>Colletotrichum lundemuthianum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
0.5	36.25 (5.74)	41.36 (8.19)	27.48 (9.48)
0.1	28.84 (7.60)	31.06 (9.77)	24.76 (15.42)

- 5 En el caso del extracto HRO8_2, se observó que la fracción más activa contra estos patógenos fue la F1 (HRO8_2_F1), con unos porcentajes de inhibición del crecimiento de los diferentes patógenos, que se presentan en las siguientes tablas (véase a continuación Tabla 7 y Tabla 8).

10 Tabla 7. Inhibición del crecimiento de los patógenos por parte de la HRO8_2_F1 del extracto HRO8_2 a varias concentraciones.

mg ml ⁻¹	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Colletotrichum lundemuthianum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
0.1	73.03 (1.25)	39.98 (8.95)	57.6 (7.89)	65.99 (5.39)
0.05	---	37.9 (4.94)	60.3 (4.47)	55.15 (6.82)

15 Tabla 8 Porcentaje de inhibición del crecimiento de distintas cepas de *Alternaria solani*, *Alternaria grandis* y *Alternaria linariae*, por parte de la fracción HRO8_2_F1 del extracto HRO8_2, a una concentración de 0.05 mg/ml

Cepa	%I (SD)	Cepa	%I (SD)	Cepa	%I (SD)
AS 10	47.97 (4.32)	AS 68	34.69 (3.4)	AG 38	35.64 (9.24)
AS 14	39.85 (2.18)	AS 72	44.47 (3.09)	AG 52	44.44 (5.49)
AS 15	52.14 (5.53)	AS 83	69.8 (1.45)	AG 54	43.23 (7.99)
AS 5	45.52 (8.79)	AS 108	57.23 (6.39)	AG 55	53.79 (1.77)
AS 17	44.12 (4.32)	AS 123	38.62 (4.17)	AG 60	42.9 (10.62)
AS 20	41.13 (1.8)	AS 129	51.09 (3.67)	AG 99	32.05 (3.21)
AS 25	39.49 (3.56)	AS 130	56.84 (2.13)	AG 152	43.15 (5.28)
AS 26	44.77 (5.54)	AS 131	53.96 (4.64)	AL 2	49.4 (3.48)
AS 35	42.9 (2.16)	AS 132	59.03 (3.89)	AL 6	34.85 (2.54)
AS 45	47.71 (2.58)	AS 133	54.34 (2.6)	AL 149	49.37 (4.78)
AS 53	46.17 (2.98)	AS 135	58.81 (3.24)	AL 39	45.7 (5.19)

AS 62	44.53 (2.28)		AS 136	55.48 (2.77)		AL 57	35.31 (1.79)
AS 65	42.97 (2.82)		AS 137	38.27 (3.67)			
AS 67	48.42 (1.67)		AS 142	41.42 (5.38)			

Finalmente, de la subfracción HRO8_2_F1F1, se obtuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. alternata* de 40.23 (11.14) a una concentración de 0.05mg/ml.

5 4.2) Actividad antifúngica mediante ensayos de dilución en líquido

Adicionalmente, la HRO8_2_F1 del extracto HRO8_2 de la cepa HRO8 *Fusarium acuminatum* fue evaluada frente a una cepa salvaje de *Alternaria brassicicola* (Abra43), cuatro mutantes nulos de la misma (AbNik1, AbFlog1, AbSch9 y AbAp1) y una cepa de *Alternaria dauci* (Ad1) (facilitados por el laboratorio del Dr. Philippe Simoneau, de la Facultad de Ciencias-Biología, de la Universidad de Angers, Francia) mediante ensayos de nefelometría. Los efectos específicos de una mutación y/o ambiente particular sobre diferentes características del crecimiento fúngico (fase de retardo, tasa de crecimiento y rendimiento de crecimiento) pueden observarse usando esta técnica.

En nuestro caso, se utilizó el método de dilución de líquidos biométricos siguiendo el procedimiento descrito por Joubert et al., (2010, *BioTechniques* 48:399-404), de la siguiente manera: se recogieron conidios de *Alternaria dauci*, *Alternaria brassicicola* (Abra43) sus mutantes nulos AbFlog1, AbNik1, AbSch9 y AbAp1 de cultivos sólidos de 7 días añadiendo caldo PD (Sigma-Aldrich) seguido de suave raspado. Las suspensiones se contaron en una cámara de Thoma para *Alternaria brassicicola* y sus disruptores y *Alternaria dauci* en una cámara de Malassez.

Estas suspensiones se diluyeron para obtener la concentración deseada (1×10^4 esporas/ml de *Alternaria dauci* y 1×10^5 esporas/ml de *Alternaria brassicicola* y sus mutantes). Los pocillos de microplaca se rellenaron con suspensiones calibradas modificadas (300 μ l/pocillo). Se realizaron controles negativos añadiendo el disolvente relevante (etanol) y el control positivo se realizó usando 125 μ M de exposición a camalexina (Sellam et al., 2007, *Plant Pathol.* 56. 296-301).

El crecimiento se registró durante 33 horas a 25 °C en un nefelómetro de microplaca basado en láser (NEPHELOstar, BMG Labtech). Durante la incubación, las microplacas se sometieron a agitación a 170 rpm durante 5 min cada 10 min. Las mediciones se realizaron cada hora con un valor de ganancia de 90 y un porcentaje del valor máximo de 20%. Cada pocillo se midió durante 0,1 s con un foco de haz de láser de 2,5 mm. Los datos fueron exportados desde el software Nephelostar Galaxy en formato ASCII y posteriormente procesados en Microsoft Excel 2010. Cada muestra de tratamiento incluyó tres repeticiones técnicas y dos repeticiones biológicas independientes. Las variables de tiempo de retraso y de tasa de crecimiento máximo se calcularon a partir de las curvas de crecimiento utilizando un método de cálculo derivado de los descritos para los cultivos de levaduras por Warringer y Blomberg (Warringer, J., Blomberg, A., 2003, *Yeast* 20, 53-67).

Usando la nefelometría se detectaron los efectos del extracto HRO8_2 de *Fusarium acuminatum* (cepa HRO8) y sus fracciones sobre Abra43 y sus mutantes nulos AbNik1, AbHog1, AbSch9 y AbAp1. Los mutantes eran altamente susceptibles a la fracción polar HRO8_2_F1.

La sensibilidad de estos mutantes nulos a los compuestos presentes en esta fracción, indica toxicidad ejercida en *A. brassicicola* a través del estrés osmótico (AbNik1 y AbSch9) y oxidativo (AbHog1 y AbAp1) (véase resultados en la Figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y en la Tabla 9).

- 5 Tabla 9. Actividad antifúngica de la fracción HRO8_2_F1 del extracto HRO8_2 en ensayos de nefelometría contra *Alternaria dauci*, *Alternaria brassicicola* (Abra43) y sus mutantes AbAp1, AbSch9, AbHog, AbNik.

Mg/ml	<i>A. dauci</i>	Abra43	AbAp1	AbSch9	AbHog 1	AbNikl
0.5	81 (12.28)	89 (8.48)				
0.1	83.6 (4.93)	82.25 (7.5)	95 (0)	92.5 (0)	93 (0)	88.5 (3.54)
0.05	72.33 (11.5)	72.17 (8.70)	85 (1.41)	78.5 (3.54)	81 (0)	78 (4.24)
0.01		22.75 (15.26)	25 (19.8)	29 (14 14)	31 (4.24)	38.5 (6.36)
0.005		15.33 (13.87)	19 (26 87)	19 (5.66)	25 (1.41)	28.5 (6.36)
IC ₅₀		0.026 (0.017-0.038)	0.017 (0.008-0.032)	0.015 (0.013-0.018)	0.014 (0.012-0.017)	0.018 (0.013-0.023)

10

4.3) Actividad antifúngica de estrés oxidativo (Reactive Oxygen Species, ROS)

15 La inhibición de *Alternaria brassicicola* y sus mutantes debido a la presencia de la fracción HRO8_2_F1 de la cepa HRO8 *Fusarium acuminatum* nos llevó a sospechar una posible generación de ROS. Dos mutantes deficientes, AbHog y AbAp1, y sus dos reguladores principales de la respuesta al estrés oxidativo (por ejemplo la MAP quinasa de AbHog y el factor de transcripción de AbAp1), fueron ligeramente más sensibles a la fracción HRO8_2_F1 (IC₅₀ = 0,014 mg/ml y 0,017 mg/ml, respectivamente) que el tipo salvaje (IC₅₀ = 0,026 mg ml⁻¹).

20 Conidios de la cepa fúngica patógena *Alternaria brassicicola* se expusieron a la fracción HRO8_2_F1 obtenido del hongo endófito HRO8 *Fusarium acuminatum*. Posteriormente para medir la producción de peróxido de hidrógeno de estas células del patógeno se usó una solución 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCF-DA, Molecular Probes) (concentración final 1 μM). Concretamente se utilizaron conidios cultivados 16 h en caldo PD, a T = 25 °C, 25 150 rpm.

30 Posteriormente para medir la producción de peróxido de hidrógeno de estas células del patógeno se usó una solución 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCF-DA, Molecular Probes) (concentración final 1 μM). Concretamente se utilizaron conidios cultivados 16 h en caldo PD, a T = 25 °C, 150 rpm. Las suspensiones se contaron en una cámara de Thoma para *Alternaria brassicicola* y luego se diluyeron para obtener la concentración deseada (1 x 10⁵ esporas/ml). Se añadieron a las suspensiones, 0,05 mg de la fracción HRO8_2_F1 del extracto HRO8_2 del hongo endófito de la invención F *acuminatum* (Cepa HRO8) y se realizaron tres tiempos de incubación: 30 min, 60 min y 120 min.

35 El control negativo se realizó añadiendo los disolventes relevantes (DMSO al 1% y etanol al 0,5%) Las observaciones se realizaron bajo microscopio fluorescente (Leica DM4500, Leica Microsystems, Software Axiovision) con las combinaciones de filtros de 480 nm de excitación y longitudes de onda de emisión de 605 nm.

La generación intracelular de productos oxidativos (ROS) se monitorizó en Abra43 y los ROS se detectaron en conidios germinados de 16 h de edad después de la incubación a 50 pg/ml durante 30, 60 y 120 minutos. Esto sugiere que la fracción polar HRO8_2_F1 tiene compuestos que son inductores potenciales de ROS intracelular en células de *A. brassicicola* (véase Figura 7).

4.4) Ensayos in vivo

Los ensayos in vivo se limitaron al estudio de la cepa HRO8 de *Fusarium acuminatum*, y se realizaron dos tipos de pruebas distintas:

4.4 1) Interacción "endófito-planta-patógeno".

Se obtuvieron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), cultivar "Tomate manzano negro" en el Centro de Conservación de la Biodiversidad Agraria de Tenerife (CBTO 1518). Las semillas fueron germinadas en papel estéril húmedo dentro de placas de vidrio cubiertas con frascos de campana (12-14 días). Después de tres semanas las plantas se trasplantaron individualmente. El sustrato usado para el primer trasplante contenía arena - turba ("Sustrato universal leader". pH 5 - 6.5, 100-300 mg 11 N, 100 - 300 mg 11 P205, 150 - 400 mg 11 K20, sales <1.5 g l⁻¹, Ostendorf Gartwerden) - humus ("Humus gomero", 24% de materia orgánica, 1,85% de N, 0,96% de P, 0,17% de Na, 0,75% de K, 6,5% de Ca, 0,8% de Mg, , 0,0037% de Cu, 0,028% de Mn) en partes iguales. Todos los ingredientes del sustrato se sometieron a autoclave y las macetas se esterilizaron (NaOCl al 15%) y se lavaron con agua.

Después de dos semanas las plántulas se trasplantaron y se trataron con el primer inóculo. El sustrato utilizado para el trasplante final contenía turba y humus (2:1). Las plantas se separaron en dos ensayos: Tratamiento 1 (T1) - al momento del trasplante se remojaron las raíces en una solución de esporas del hongo endófito HRO8 (1x10⁶ ml⁻¹) y Tratamiento 2 (T2) - en el momento del trasplante se inoculó una solución de esporas endófitas fúngicas en el suelo.

Para T1 cada plántula se sumergió previamente en agua estéril y se introdujo adicionalmente en un vial con 4 ml de solución de esporas (1x10⁵/ml) y se dejó durante un minuto. Posteriormente, las plántulas se plantaron individualmente y se regaron. Para T2 se realizó la misma concentración de solución de esporas y se diluyó 10 veces con agua estéril. Después de que las plántulas se plantaron individualmente y se regaron escasamente, se añadieron 10 ml de la solución de esporas diluida a la zona más próxima a la plántula y se regaron de nuevo. También se mantuvo un control con plantas sin inóculo.

Treinta días después del trasplante se inocularon las plantas de ambos ensayos (T1 PB30 y T2 PS30) con la cepa fúngica patógena *Alternaria alternata*. Cada planta se micropulverizó en toda la superficie aérea con 4 ml de solución de esporas (1,8 x 10⁵ conidios/planta) bajo la campana extractora. Se mantuvieron dos tipos de controles en ambos tratamientos: plantas sin inocular el patógeno y plantas inoculadas con el patógeno pero sin inoculación de hongos endófitos.

Sesenta días después del trasplante, se sometió otro conjunto de plantas a los mismos tratamientos (T1 PB60 y T3 PS60); Se mantuvieron los mismos controles. Hasta los dos meses, las plantas fueron regadas con 200 ml de agua/planta/48 horas. Después de dos meses, las plantas se regaron con 300 ml de agua/planta/48 horas. Las plantas en general se mantuvieron a 25°C y con un fotoperíodo de 12 h (luz/oscuridad). Tres meses después del primer trasplante, se estudiaron las plantas con respecto a sus medidas fisiológicas, y se realizó el aislamiento fúngico y los análisis posteriores.

Todas las plantas se sometieron a un ensayo de aislamiento fúngico, tratando las muestras de plantas como en el caso de un aislamiento fúngico independientemente de la apariencia

5 sintomática o asintomática de alternariosis. La esterilización superficial de fragmentos de plantas se realizó como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1, de acuerdo con Cosoveanu et al. (2016, *Mycosphere* 7, 102-117). Cada planta se separó en raíz, tallos y hojas. Se seleccionaron raíces y tallos de diferentes alturas de la planta: base, media y apical. Las hojas fueron seleccionadas de forma similar y se hizo una distinción adicional entre la base, el medio y la parte apical de cada hoja de base / hoja media / hoja superior.

10 Se sembraron seis fragmentos de raíz y seis fragmentos de tallo de cada planta, con dos repeticiones por posición de altura. Se sembraron 18 fragmentos de hojas por planta seleccionando seis fragmentos de cada posición de altura (base/medio/superior). Posteriormente, los seis fragmentos de hojas de cada posición de altura se dividieron en la posición base/media/superior con 2 repeticiones cada una. Los dos fragmentos de hojas finales seleccionados fueron uno del pecíolo y uno de la lámina. Cada fragmento de repetición se seleccionó de una hoja y una raíz diferentes. En total, se sembraron 1290 fragmentos de todas las plantas para el posterior aislamiento del hongo endófito y del patógeno.

20 Para todas las plantas fueron medidas la altura, el número y la altura de los entrenudos, el número de flores haciendo distinción entre los brotes y las flores florecidas y finalmente el número de hojas y folíolos. El peso fresco y seco de las plantas se midió tanto en la parte aérea como en las raíces. Las raíces de las plantas se lavaron y secaron y posteriormente se pesaron. Fragmentos de la parte aérea y las raíces se secaron durante varios días a $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evaluar el peso seco. Las observaciones de los síntomas se realizaron en hojas y folíolos contando los folíolos con: clorosis, clorosis + ápice necrótico, clorosis + áreas necróticas, áreas necróticas.

25 Para todos los datos obtenidos (i.e. aislamiento y medidas biométricas), la significancia estadística se realizó utilizando las pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney. Los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 21.0.

30 En relación a las plantas con el T1, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, ya que el crecimiento de las plantas pudo verse afectado por la manipulación de las raíces durante el desarrollo del tratamiento. Sin embargo los resultados del T2 indicaron que la cepa fúngica endófito *Fusarium acuminatum* HRO8 no sólo no causó daño a las plantas de tomate cuando se aplicó directamente al suelo sino que también protegió al huésped contra *Alternaria alternata*.

35 4.4.2) Test "extractos activos del hongo endófito (EHE)-semillas-patógeno": test del extracto 2 de *Fusarium acuminatum* HRO8 sobre *Alternaria brassicicola*.

40 En este experimento se realizaron evaluaciones de contaminación de semillas con *Alternaria brassicicola* (Abra43) en semillas de rábano comercial (*Raphanus sativus* variedad "French breakfast 3"), en presencia de extractos de hongos endófitos activos. Las pruebas se realizaron de acuerdo con Iacomí-Vasilescu et al. (2004, *Crop Prot.* 23, 481-488)

45 Las semillas se desinfectaron primero por inmersión en etanol al 80% durante 5 minutos, se aclararon con agua destilada estéril, posteriormente se remojaron durante 1 hora en una suspensión de esporas calibrada (10^5 esporas/ml) y se secaron bajo la campana de flujo laminar sobre papel de filtro estéril. Las semillas de rábano se remojaron durante 15 y 30 minutos en cada extracto del hongo endófito a una concentración de 1 mg/ml y se secaron en un flujo laminar sobre papel de filtro estéril.

50 Para cada extracto/tratamiento se ensayaron 100 semillas en tres repeticiones. El tratamiento de control negativo se realizó remojando las semillas en agua destilada esterilizada. El experimento se llevó a cabo dos veces. Las semillas se colocaron en medio acuoso de agar

(2% m/v) en placas de Petri y el índice de desarrollo (ID) y el índice de necrosis (IN) se evaluó para 100 semillas después de 7 días de incubación a 24 °C en la oscuridad.

5 Las etapas de desarrollo se evaluaron con una escala de 0 a 3 (0= sin germinación, 1 = emergencia de raíz. 2= emergencia de cotiledón. 3= semilla bien desarrollada) (véase Figura 8). Se evaluó la gravedad de la enfermedad en las plántulas utilizando una escala de 0-9 (0= sin síntomas de enfermedad. 1=1-2 mm de necrosis en el tallo de la plántula, 3= extensión de la necrosis alrededor del tallo, 5= un tercio del sistema radicular o hipocotilo afectado, 7= todo el sistema radicular o parte aérea afectada y cubierta de esporas, 9= plántulas muertas y cubiertas de esporas) (véase Figura 9). También se analizó a la incidencia de plántulas con necrosis típica: $I = (\text{grado de gravedad de la enfermedad} \times N^{\circ} \text{ de plántulas})$; El grado "0" no fue considerado.

15 La eficacia del tratamiento con el extracto HRO8_2 de la cepa HRO8 *Fusarium acuminatum* sobre *Alternaria brassicicola* en las plántulas se calculó como: $(\text{incidencia en el control} - \text{incidencia en el tratamiento} / \text{incidencia en el control}) \times 100$; (Sadda, N., Varma, R.. J. Indian bot. Soc. 94, 126-130, 2015.). Las semillas se dividieron en cinco lotes: DNT - semillas no tratadas desinfectadas, semillas contaminadas desinfectadas con DC, semillas tratadas desinfectadas con DT (durante 5 y 30 minutos), semillas tratadas contaminadas con DCT (durante 5 y 30 minutos); NDCT - semillas no desinfectadas ni tratadas.

25 Los resultados indican que después de 30 minutos de incubación, el índice de necrosis de las plántulas fue solo del 26% del valor del grupo de control de plántulas no tratadas. El índice de desarrollo se incrementó para ambos tratamientos (2.72 y 2.77 para 5 minutos y 30 minutos de incubación, respectivamente) comparado con el valor del grupo de semillas no tratadas (1.57) (véase Figura 10).

Aplicación de la invención y ventajas sobre el estado actual de la técnica

30 Los extractos de hongos endófitos aislados de *Artemisia* spp, con actividad biocida aquí descritos, pueden ser utilizados solos o en combinación con otros compuestos para el desarrollo y formulación de productos fitosanitarios agrícolas.

35 Estos extractos de las cepas endófitas con actividad biocida descritas en el presente documento pueden ser producidos a gran escala por cultivo del microorganismo en biorreactores, que pueden posteriormente ser usados de manera directa en la formulación de compuestos fitosanitarios o bien, pueden ser purificados por métodos apropiados y obtener fracciones/moléculas con una actividad biológica concreta.

40 Es importante aclarar que a lo largo de la descripción, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto de cultivo de hongos endófitos de *Artemisia* spp., con actividad biocida de interés agrícola, caracterizados porque los hongos son preferentemente HTF58 *Alternaria alternata* (CECT20971) y HRO8 *Fusarium acuminatum* (CECT20972), endófitos de *Artemisia thuscula* y *Artemisia austriaca* respectivamente.
- 10 2. Producto bioactivo de cultivo según la reivindicación 1 que incluyen el producto obtenido de cada uno de los hongos endófitos al igual que cada una de sus fracciones, subfracciones o compuestos obtenidos mediante los procesos descritos.
- 15 3. Producto bioactivo de cultivo según la reivindicación 1 cuya actividad biocida se ejerce frente a fitopatógenos de interés agrícola, preferentemente hongos.
- 20 4. Producto bioactivo de cultivo según la reivindicación 1 donde la actividad fungicida se ejerce frente a hongos, preferentemente frente a *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria grandis*, *Alternaria dauci*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria linariae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Colletotrichum lundemuthianum*.
- 25 5. Producto bioactivo de cultivo según la reivindicación 1 donde la actividad antifúngica se ejerce mediante la inhibición de crecimiento del hongo fitopatógeno en cuestión.
- 30 6. Uso de los productos bioactivos de cultivo de la reivindicación 1, de un producto de extracción, fracción, subfracción, o compuesto de los mismos, ya sea de forma aislada o combinada, para la formulación de productos fitosanitarios antifúngicos.
7. Uso de HRO8 *Fusarium acuminatum* (CECT20972), como microorganismo que puede ser aplicado al suelo, bien directamente o mediante su formulación en una sustancia inerte, para la protección de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) frente al hongo patógeno *Alternaria alternata*.

Figura 1: Monitorización nefelométrica del crecimiento para evaluar la susceptibilidad antifúngica. Las curvas del crecimiento de la cepa salvaje *Abra43* después de exposición a la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2*, camalexina y condiciones estándar; C2 – crecimiento bajo condiciones estándar, C4 – camalexina a 0.025 mg/ml; F6 E – fracción *HRO8_2_F1* a distintas concentraciones; E7 – 0.001 mg/ml; E6 – 0.005 mg/ml; E5 – 0.01 mg/ml; E4 – 0.05 mg/ml; E3 – 0.1 mg/ml; E2 – 0.5 mg/ml. El eje-y corresponde a unidades relativas nefelométricas (RNUs).

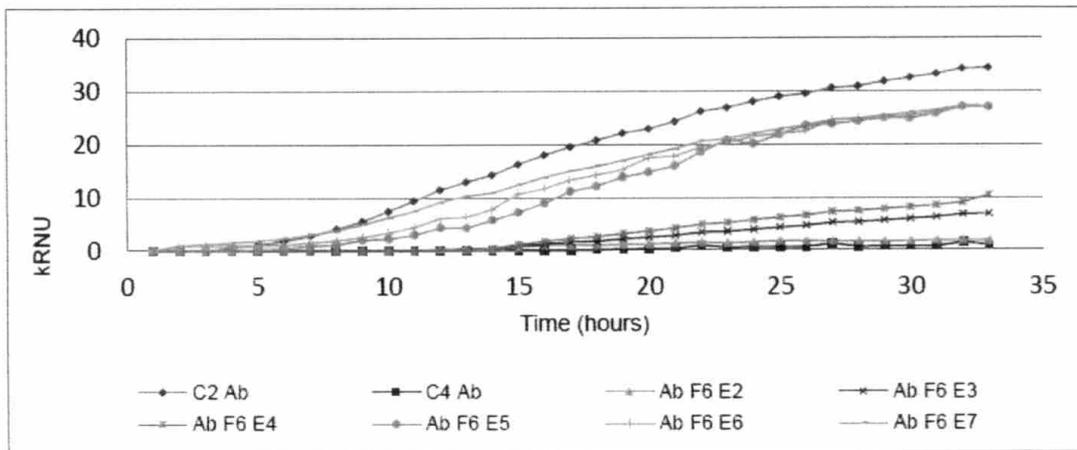


Figura 2: Monitorización nefelométrica del crecimiento para evaluar la susceptibilidad antifúngica. Las curvas del crecimiento de la cepa mutante *AbAp1* después de exposición a la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2* y condiciones estándar; C2 – crecimiento bajo condiciones estándar; F6 E – fracción *HRO8_2_F1* a distintas concentraciones; E6 – 0.005 mg/ml; E5 – 0.01 mg/ml; E4 – 0.05 mg/ml; E3 – 0.1 mg/ml. El eje-y corresponde a unidades relativas nefelométricas (RNUs).

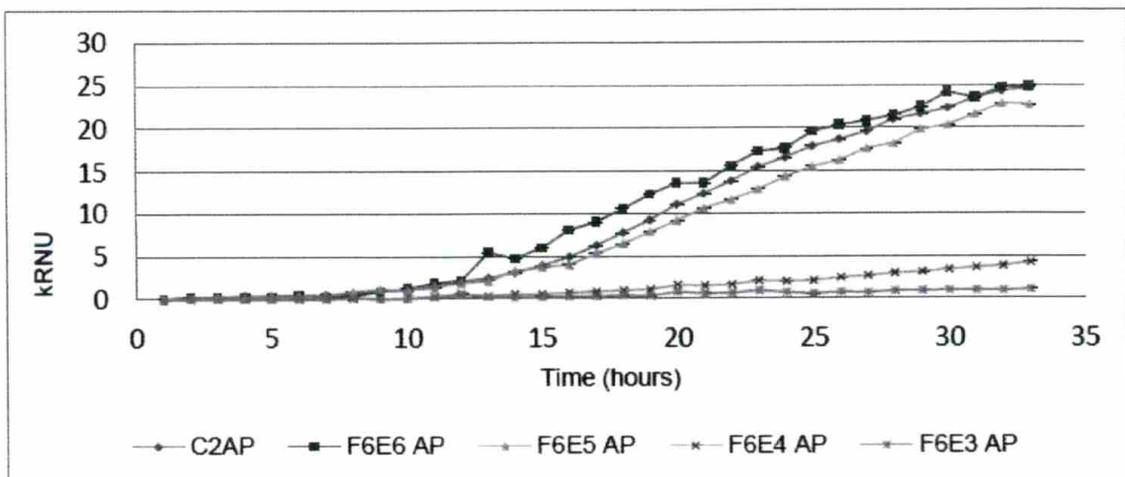


Figura 3. Monitorización nefelométrica del crecimiento para evaluar la susceptibilidad antifúngica. Las curvas del crecimiento de la cepa mutante *AbHog1* después de exposición a la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2* y condiciones estándar; C2 – crecimiento bajo condiciones estándar; F6 E – fracción *HRO8_2_F1* a distintas concentraciones; E6 – 0.005 mg/ml; E5 – 0.01 mg/ml; E4 – 0.05 mg/ml; E3 – 0.1 mg/ml. El eje-y corresponde a unidades relativas nefelométricas (RNUs).

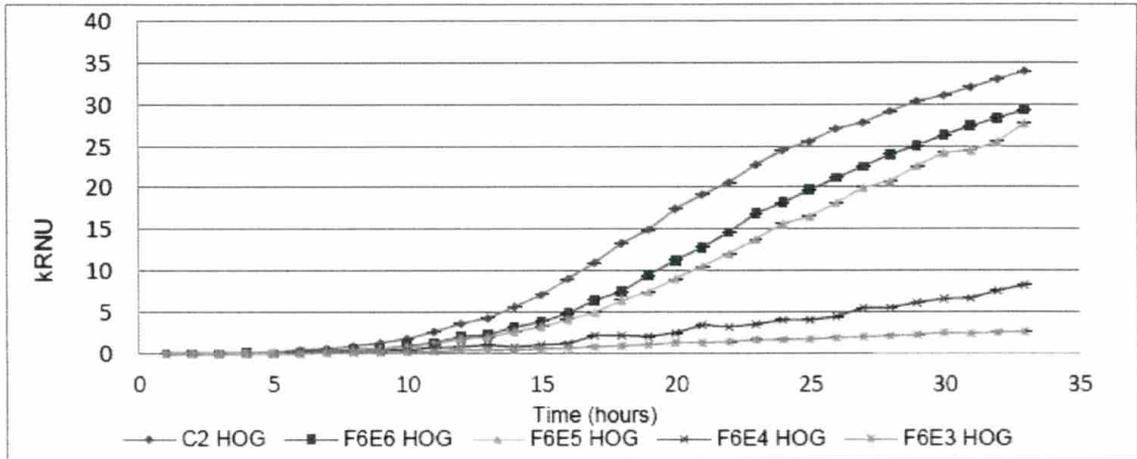


Figura 4. Monitorización nefelométrica del crecimiento para evaluar la susceptibilidad antifúngica. Las curvas del crecimiento de la cepa mutante *AbNik1* después de exposición a la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2* y condiciones estándar; C2 – crecimiento bajo condiciones estándar; F6 E – fracción *HRO8_2_F1* a distintas concentraciones; E6 – 0.005 mg/ml; E5 – 0.01 mg/ml; E4 – 0.05 mg/ml; E3 – 0.1 mg/ml. El eje-y corresponde a unidades relativas nefelométricas (RNUs).

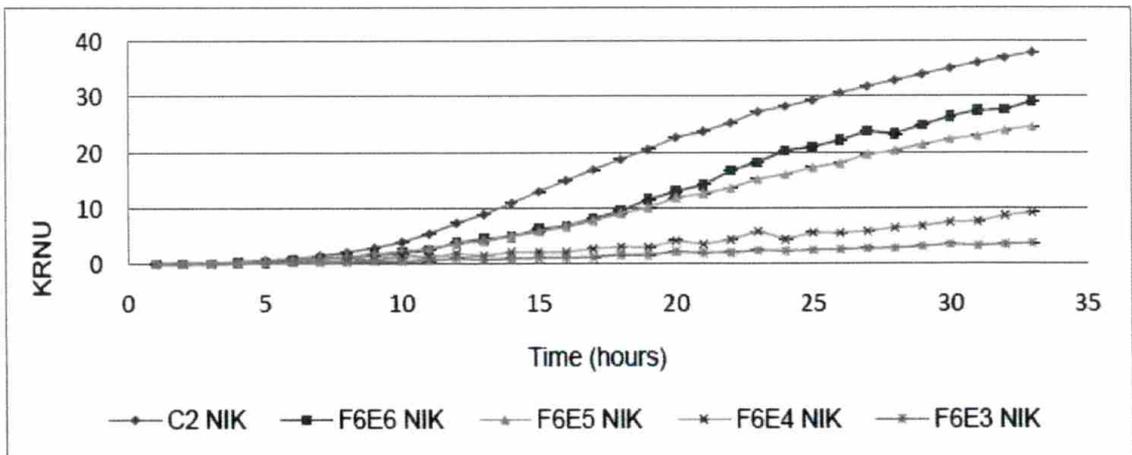


Figura 5. Monitorización nefelométrica del crecimiento para evaluar la susceptibilidad antifúngica. Las curvas del crecimiento de la cepa mutante *AbSch9* después de

exposición a la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2* y condiciones estándar; C2 – crecimiento bajo condiciones estándar; F6 E – fracción *HRO8_2_F1* a distintas concentraciones; E6 – 0.005 mg/ml; E5 – 0.01 mg/ml; E4 – 0.05 mg/ml; E3 – 0.1 mg/ml. El eje-y corresponde a unidades relativas nefelométricas (RNU).

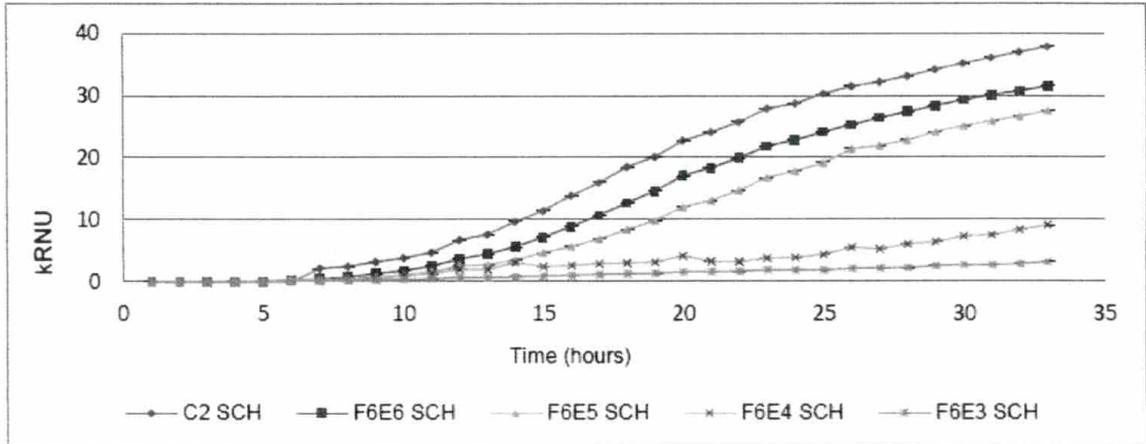


Figura 6. Monitorización nefelométrica del crecimiento para evaluar la susceptibilidad antifúngica. Las curvas del crecimiento de la cepa *A. dauci* después de exposición a la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2* y condiciones estándar; C2 – crecimiento bajo condiciones estándar; F6 E – fracción *HRO8_2_F1* a distintas concentraciones; E6 – 0.005 mg/ml; E5 – 0.01 mg/ml; E4 – 0.05 mg/ml; E3 – 0.1 mg/ml. El eje-y corresponde a unidades relativas nefelométricas (RNU).

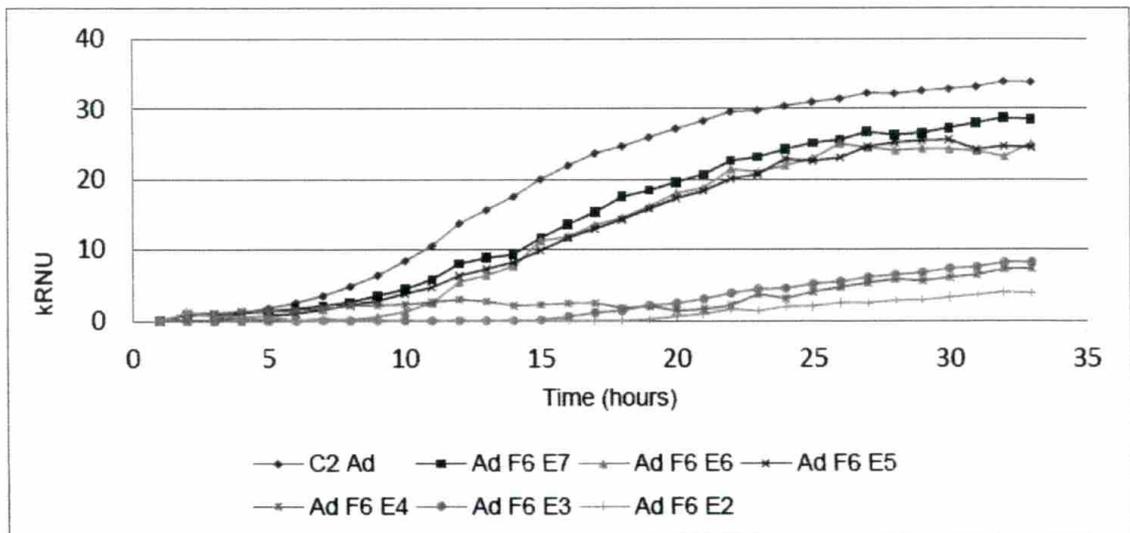


Figura 7. Visualización de los síntomas del estrés oxidativo en *A. brassicicola* tratados con la fracción *HRO8_2_F1* del extracto *HRO8_2*. ROS dentro de conidios e hifas de conidios germinados incubados durante 30 minutos (arriba), 60 minutos (medio) y 120 minutos (abajo). Los controles (DMSO 1% y EtOH 0,05%) se muestran en el segundo

panel (arriba, medio, abajo). Para cada panel el lado izquierdo corresponde a microscopía de campo brillante y el lado derecho corresponde a microscopía de fluorescencia

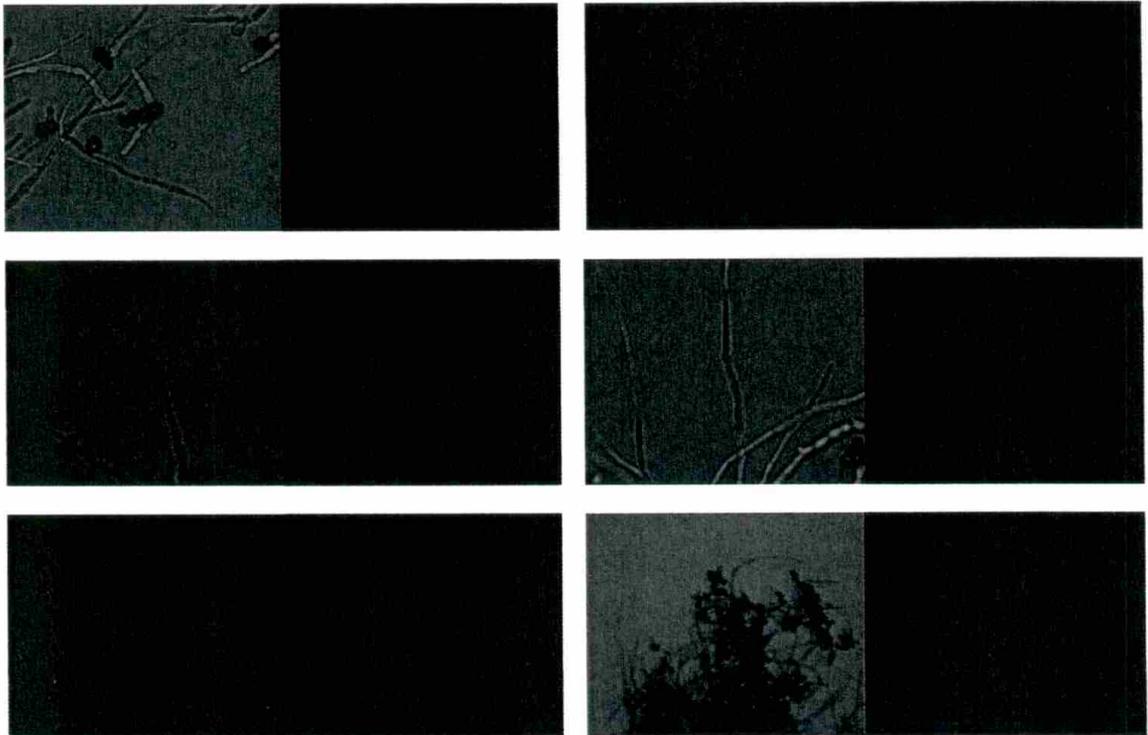


Figura 8. Índices de desarrollo (ID) en las semillas de rábano.

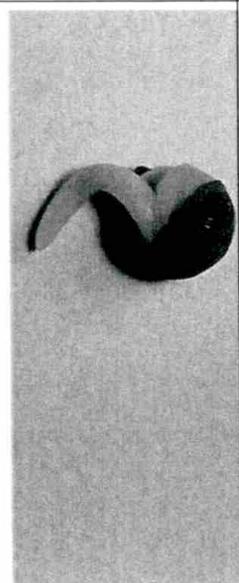
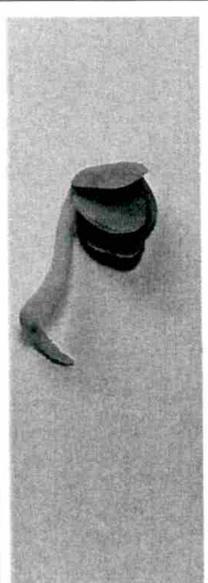
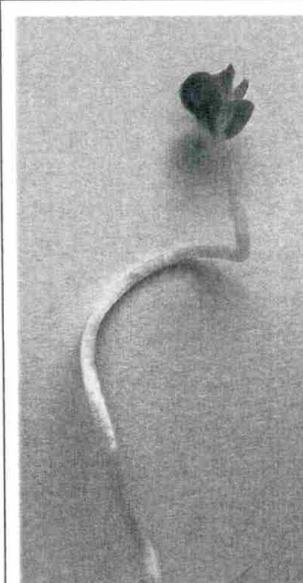
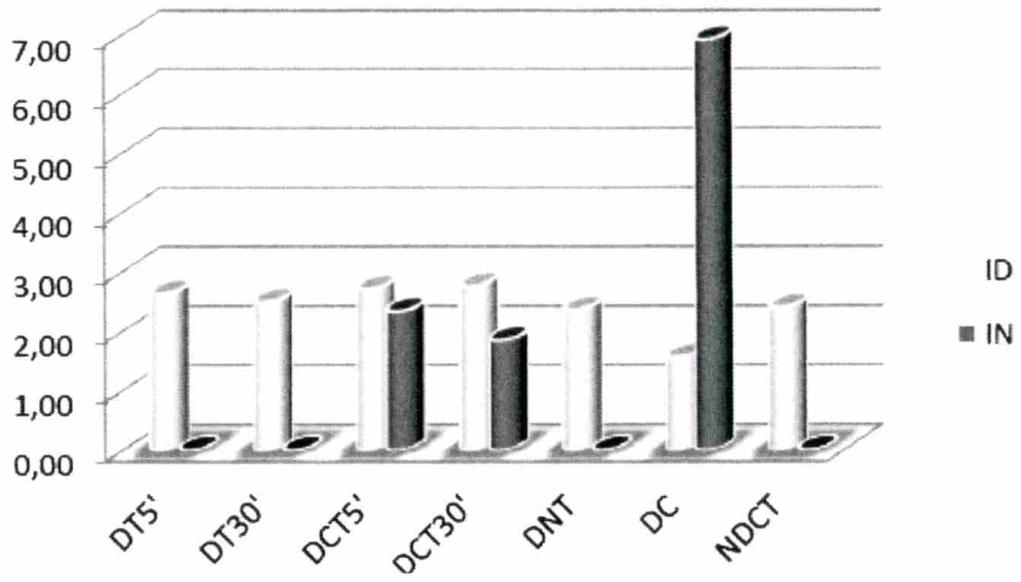
Índice de desarrollo (ID)			
Sin germinación „0”	Emergencia de raíz „1”	Emergencia de cotiledon „2”	Plantula bien desarrollada „3”
			

Figura 9. Índice de necrosis (IN) de la enfermedad en las plántulas de rábano.

IN	Sintomas
0	Sin síntomas
1	1-2 mm necrosis en el tallo
3	Extensión de la necrosis alrededor del tallo
5	1/3 del Sistema radicular o hipocotilo afectado
7	Todo el Sistema radicular o parte aérea afectada y cubierta de esporas
9	Plántulas muertas y cubiertas de esporas

Figura 10. Ensayos *in vitro* del extracto *HRO8_2* como tratamiento protector de las semillas de rábano frente a *Abra43*: DNT - Desinfectado y no tratado; DC - Desinfectado y contaminado; NDCT - no desinfectado, no tratado y no contaminado; DT5 '- Desinfectado y tratado durante 5 minutos; DT30 '- Desinfectado y tratado durante 5 minutos; DCT5 '- Desinfectado, contaminado y tratado durante 5 minutos; DCT30 '- Desinfectado, contaminado y tratado durante 30 minutos; ID - Índice de desarrollo; IN - Índice de necrosis





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201700680

②² Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.2017

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01N65/00** (2009.01)
A01P3/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JP 2003274931 A (NIPPON SODA CO) 30/09/2003 (resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 13/03/2018]. Recuperado de EPOQUENET, Base de datos WPI.	1-7
A	JP 2001233721 A (NIPPON SODA CO) 28/08/2001 (resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 13/03/2018]. Recuperado de EPOQUENET, Base de datos WPI.	1-7
A	WO 2008007251 A2 (UNIV DEGLI STUDI UDINE et al.) 17/01/2008, Reivindicaciones.	1-7
A	CN 102204570 A (UNIV JILIANG CHINA) 05/10/2011(resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 13/03/2018]. Recuperado de EPOQUENET, Base de datos WPI.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.03.2018

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, A01P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP