

Tesis Doctoral

Hongos endofitos septados en raíces de *Glycine max*: diversidad, caracterización y estudio de la interacción

Rothen, Carolina Paola

2015-08-14

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rothen, Carolina Paola. (2015-08-14). Hongos endofitos septados en raíces de *Glycine max*: diversidad, caracterización y estudio de la interacción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rothen, Carolina Paola. "Hongos endofitos septados en raíces de *Glycine max*: diversidad, caracterización y estudio de la interacción". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-08-14.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Hongos endofitos septados en raíces de *Glycine max*:
diversidad, caracterización y estudio de la interacción**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Carolina Paola Rothen

Director de Tesis: Dra. María Alejandra Rodríguez

Consejero de Estudios: Dra. Alicia Margarita Godeas

Buenos Aires, 14 de agosto de 2015

HONGOS ENDOFITOS SEPTADOS EN RAÍCES DE *GLYCINE MAX*: DIVERSIDAD, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN

RESUMEN

Los hongos endofitos septados oscuros (DSE) han sido encontrados colonizando asintómicamente las raíces de las plantas, entre las que se encuentra *Glycine max*, una oleaginosa de gran importancia económica. Aunque se caracterizan por su abundancia en diversos hábitats, poco se sabe sobre sus efectos en el hospedante. Dos aspectos sobre los que mostrarían mayor influencia son la nutrición vegetal y la respuesta de la planta frente a condiciones de estrés biótico y abiótico.

Este trabajo se centra en cinco objetivos principales: i) Aislar cepas autóctonas de hongos DSE a partir de plantas de *Glycine max*, ii) Identificar dichas cepas utilizando caracteres morfológicos y moleculares, iii) Establecer la diversidad de las comunidades de estos endofitos asociadas a *Glycine max* en campos agrícolas con diferente historia de manejo, iv) Caracterizar los aislamientos en cuanto a la capacidad de solubilizar fósforo y producir enzimas hidrolíticas y promotores del crecimiento y, v) Evaluar los efectos en la planta hospedante, particularmente considerando el empleo y facilitación de diferentes fuentes nitrogenadas.

Se obtuvieron 168 cultivos de hongos y 47 de ellos fueron clasificados como hongos dematiáceos. Fueron identificados 18 especies y 7 morfotipos, de los cuales, sólo 9 aislamientos fueron considerados dentro de la categoría de “endofitos estrictos” y pertenecieron a las especies: *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens*, *Paraphoma radicina*, *Coniothyrium cerealis*, *Cladosporium* sp., *Humicola fuscoatra* y a tres formas no identificadas, estériles. En cuanto a la diversidad de las comunidades, los dos suelos fueron igualmente diversos, sin embargo al comparar las distintas etapas fenológicas muestreadas, las comunidades pertenecientes al segundo muestreo, etapa R3, fueron menos diversas y equitativas, predominando *Alternaria alternata* y *Paraphoma radicina*, las únicas dos especies compartidas por las comunidades en estudio, lo que determinó una similitud baja entre ellas.

Se encontró una relación entre las capacidades enzimáticas y el comportamiento en la planta hospedante, donde los endofitos estrictos fueron los que menos actividades enzimáticas presentaron. La producción de AIA fueron variables dentro de las categorías, y no fueron capaces de solubilizar fósforo inorgánico.

En los ensayos de facilitación y translocación de N, uno de los endofitos, *Cladosporium sphaerospermum*, favoreció el crecimiento de plantas de *Glycine max*. Los mismos resultados fueron obtenidos en condiciones de invernadero, además cuando las plantas fueron co-inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno, desarrollaron mayor cantidad de nódulos. Este hongo también promovió el crecimiento de *Triticum aestivum*. Estos resultados positivos se dieron particularmente en condiciones donde el nitrógeno no se encontraba asimilable

Los resultados obtenidos indican que los hongos DSE comprenden un diverso grupo, entre los que se encuentran algunos endofitos capaces de favorecer el crecimiento de la planta hospedante, particularmente en ciertas condiciones y en especial, en relación con el uso del Nitrógeno

PALABRAS CLAVES: endofitos septados oscuros, raíz, *Glycine max*, *Triticum aestivum*, Nitrógeno.

DARK SEPTATE FUNGAL ENDOPHYTES ON ROOTS OF *GLYCINE MAX*: DIVERSITY, CHARACTERIZATION AND STUDY OF INTERACTION

ABSTRACT

Dark septate endophytes (DSE) were found asymptotically colonizing the roots of plants, among which is *Glycine max*, an oil crop of great economic importance. Although they are characterized by its abundance in different habitats, little is known about its effects on the host. Two aspects that would show greater influence are plant nutrition and plant response against biotic and abiotic stresses.

The objectives of this work were: i) to isolate native DSE fungal strains from *Glycine max* plants, ii) to identify these strains using morphological and molecular characters iii) to establish the diversity of the communities of these endophytes associated with *Glycine max* in agricultural fields with different management history, iv) to characterize the isolates in terms of the ability to solubilize phosphorus and produce hydrolytic enzymes and growth promoters and v) to assess the effects on the host plant, particularly considering employment and facilitating different nitrogen sources.

An total of 168 fungal isolates were obtained and 47 of them were classified as dematiaceous. 18 species and 7 morphotypes were identified, of which only 9 isolates were considered within the category of "strictly endophytes" and belonged to the species: *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens*, *Paraphoma radicina*, *Coniothyrium cerealis*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Hemicola fuscoatra* and three unidentified forms, sterile. Regarding the diversity of the communities, the two soils studied were equally diverse, however when comparing the different phenological stages sampled, communities belonging to the second stage (R3) were less diverse and equitable. The only two species shared by both communities at stage R3 were *Alternaria* and *Paraphoma radicina*.

A link between the enzymatic capabilities and behavior in the host plant, where strict endophytes were least had found enzymatic activities. AIA production were variable within categories, and were not able to solubilize inorganic phosphorus.

In trials facilitation and translocation of N, one of the endophytes, *Cladosporium sphaerospermum*, favored the growth of *Glycine max* plants. The same results were obtained under greenhouse conditions, also when plants were co-inoculated with nitrogen-fixing bacteria, developed more nodules. This fungus also promoted the growth of *Triticum aestivum*. These results are particularly positive given in conditions where nitrogen was not assimilable.

The results indicate that the DSE fungi comprise a diverse group, among which some endophytes are capable of favoring growth of the host plant, particularly under certain conditions and particularly in connection with the use of Nitrogen.

KEYWORDS: dark septate endophytes, root, *Glycine max*, *Triticum aestivum*, Nitrogen.

AGRADECIMIENTOS

A Ale por dirigir esta tesis, gracias!! y a Alicia por darme un lugar en el laboratorio.

A mi familia porque nunca dejo de apoyarme. A mis padres por su incondicionalidad, a Flor y Marce porque estuvieron en cada momento y en cada detalle, a mis sobris. A Marcos, a mi hijo que soportó todo lo que esto implica. A Gina y Caro por darme una mano y a Sebastián.

A todos mis compañeros y amigos del Lab 12. Gracias: Agus, Mari, Gaby y Tai por los millones de mates, consejos y risas que compartimos, a Dani, a José. A Ali por su ayuda con el nombre de los honguitos. A Mariana, Vane, Roxi y Lau por compartir lindos momentos.

A mis amigas extra laboratorio, Mer, Dai, Mica, Ceci y Belu por formar parte de mi vida.

A Flor, amiga de emociones. A mis amigos micólogos, Pato, Vicky, Ema y Vale.

A mis amigos de Areco: Maca, Pame, Blan y Yesi.

A CONICET por darme la posibilidad de trabajar en lo que mas me gusta hacer.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| HIPÓTESIS GENERALES | 8 |
| OBJETIVOS GENERALES | 9 |
| CAPÍTULO I: AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y DIVERSIDAD DE HONGOS ENDOFITOS SEPTADOS OSCUROS DE RAÍZ | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| HIPOTESIS PARCIALES | 13 |
| OBJETIVOS PARCIALES | 13 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| Descripción del sitio de muestreo | 14 |
| Recolección de las muestras | 15 |
| Aislamiento de hongos endofitos de raíz | 16 |
| Esterilización superficial | 16 |
| Diseño experimental del aislamiento | 17 |
| Conservación de los cultivos fúngicos | 18 |
| Caracterización por morfotipos | 18 |
| Identificación morfológica | 18 |
| Identificación molecular | 19 |
| Análisis filogenéticos | 19 |
| Análisis ecológicos | 20 |
| Diversidad alfa | 20 |
| Diversidad beta | 21 |
| RESULTADOS | 22 |
| Aislamientos fúngicos | 22 |
| Identificación | 23 |
| Análisis filogenéticos | 24 |
| Análisis ecológicos | 29 |

| | |
|--|-----------|
| Diversidad de las comunidades de hongos dematiáceos | 29 |
| Comparación entre las comunidades de hongos dematiáceos | 32 |
| DISCUSIÓN..... | 34 |
| CAPÍTULO II: SELECCIÓN DE HONGOS ENDOFITOS SEPTADOS: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS EN SU HOSPEDANTE Y SU POTENCIAL EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL..... | 39 |
| INTRODUCCIÓN..... | 40 |
| HIPÓTESIS PARCIALES..... | 44 |
| OBJETIVOS PARCIALES..... | 44 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 45 |
| Resíntesis in vitro con <i>Glycine max</i> | 45 |
| Inoculación de las plántulas..... | 45 |
| Cultivo in vitro de <i>Glycine max</i> | 45 |
| Producción de AIA..... | 46 |
| Solubilización de P..... | 47 |
| Medición de la actividad de enzimas hidrolíticas..... | 47 |
| Inducción de la producción de enzimas hidrolíticas..... | 47 |
| Reacciones enzimáticas..... | 48 |
| Cuantificación de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson..... | 49 |
| RESULTADOS..... | 51 |
| Re-síntesis de los aislamientos en plantas de <i>Glycine max</i> | 51 |
| Colonización de las raíces de G. max..... | 53 |
| Actividad de enzimas hidrolíticas, AIA y solubilización de fósforo..... | 64 |
| Análisis de los resultados..... | 65 |
| DISCUSIÓN..... | 70 |
| CAPÍTULO III: FUENTES DE NITRÓGENO: UTILIZACIÓN, FACILITACIÓN Y TRANSLOCACIÓN..... | 77 |
| INTRODUCCIÓN..... | 78 |
| HIPÓTESIS PARCIALES..... | 80 |
| OBJETIVOS PARCIALES..... | 80 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 81 |

| | |
|--|-----------|
| Utilización de fuentes orgánicas e inorgánicas de Nitrógeno..... | 81 |
| Utilización de fuentes nitrogenadas por los endofitos..... | 81 |
| Utilización de fuentes nitrogenadas por <i>Glycine max</i> | 81 |
| Facilitación de fuentes orgánicas de Nitrógeno en diferentes relaciones C:N..... | 82 |
| Diseño experimental..... | 82 |
| Cultivo in vitro..... | 83 |
| Inoculación de las plántulas de <i>G. max</i> con los endofitos..... | 83 |
| Condiciones de crecimiento..... | 84 |
| Transferencia de Nitrógeno..... | 84 |
| Cultivo in vitro..... | 84 |
| Estudios anatómicos..... | 86 |
| RESULTADOS..... | 87 |
| Utilización de fuentes orgánicas e inorgánicas de Nitrógeno..... | 87 |
| Facilitación de fuentes orgánicas de Nitrógeno..... | 90 |
| Translocación de N..... | 92 |
| Estudios anatómicos..... | 93 |
| DISCUSIÓN..... | 94 |
| CAPÍTULO IV: LOS ENDOFITOS SEPTADOS OSCUROS Y SU USO POTENCIAL COMO BIOINOCULANTES..... | 99 |
| INTRODUCCIÓN..... | 100 |
| HIPÓTESIS PARCIALES..... | 103 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 103 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 104 |
| Ensayo en invernadero con <i>Glycine max</i> | 104 |
| Diseño experimental..... | 104 |
| Armado de las macetas y condiciones de crecimiento..... | 105 |
| Ensayo en invernadero con <i>Triticum aestivum</i> | 105 |
| Diseño experimental..... | 105 |
| Armado de las macetas y condiciones de crecimiento..... | 106 |
| Análisis estadísticos..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| RESULTADOS..... | 107 |
| Ensayo en invernadero con <i>Glycine max</i> | 107 |
| Ensayo en invernadero con <i>Triticum aestivum</i> | 111 |
| DISCUSIÓN..... | 114 |
| CONCLUSIONES..... | 118 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 120 |
| ANEXO..... | 132 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los microorganismos del suelo en general, y aquellos presentes en la rizósfera, en particular, tales como hongos, actinomicetes, bacterias y protozoos influyen en el crecimiento de las plantas y esta influencia puede hacerse más evidente cuando, además, son capaces de formar una asociación simbiótica con ella (Bacon y White 2000).

La comunidad de microorganismos que crecen dentro de las plantas presentan una significativa influencia en la comunidad vegetal, sin embargo, la complejidad del par planta-microorganismo trae grandes dificultades a la hora de establecer la contribución de cada miembro en forma individual (Schulz y Boyle 2005). Existe poca información acerca de la interacción entre el medio ambiente, la respuesta fisiológica de los microorganismos, los cambios en la composición de la comunidad y en última instancia, en la dinámica del ecosistema (Marschnera 2003)

En general, el papel de los microorganismos en la formación de las comunidades de plantas ha sido subestimado (Schulz y Boyle 2005). Entre ellos, los hongos, se encuentran entre los más abundantes y diversos (Vandenkoornhuysen y col. 2002) y, en el caso particular de los saprótrofos y los hongos micorrícicos arbusculares (MA) han sido los más estudiados.

Entre los habitantes de las raíces, los hongos que forman micorrizas constituyen uno de los grupos más ampliamente estudiados. Éstos se destacan tanto por el número de hospedantes (Smith y Read 1997) como por su importancia, los formadores de micorrizas arbusculares (MA) y de ectomicorrizas (EM). Se conocen alrededor de 150 especies de hongos MA pertenecientes al phylum Glomeromycota (Schüßler y col. 2001), en cambio la mayoría de las EM son Basidiomicetes y se conocen 6000 especies. Las micorrizas cumplen numerosas funciones que favorecen a su planta hospedante y absorben los nutrientes no disponibles y lo translocan hacia la planta, facilitando la transferencia de nutrientes entre las plantas y otorgando resistencia frente al estrés hídrico (Smith y Read 1997). Los hongos MA están presentes en la mayoría de las plantas herbáceas y muchas familias de plantas leñosas, en cambio las EM se originan en un limitado número de especies de plantas leñosas. En la actualidad hay claras evidencias de que las micorrizas tienen una importante función en los

ecosistemas (Read 1991). Sin embargo, todas las plantas en sistemas naturales se encuentran asociadas a hongos endofíticos que no pertenecen a esos grupos y que dan origen en muchos casos, a relaciones simbióticas responsables de la adaptación al estrés biótico y abiótico, y determinan la supervivencia de ambos miembros de la simbiosis en tales condiciones. Estos hongos son importantes en la estructura, función y salud de las comunidades de plantas, pero no siempre han podido ser estudiados en detalle (Bacon y White 2000).

El término endofito es utilizado actualmente para hacer referencia a aquellos microorganismos que colonizan inter y/o intracelularmente tejido vegetal sano, persistiendo por todo o parte del ciclo de vida de la planta, sin causarle síntomas de enfermedad (Wilson 1995). Dado que el término carece de valor taxonómico, incluye una gran diversidad de organismos desde algas a bacterias y hongos. Una de las clasificaciones más recientes es la de Rodríguez y col. (2009), quienes han considerado entre otros su diversidad, el rango de hospedantes, los órganos y tejidos vegetales a los que se asocian, los tipos de colonización y transmisión y los efectos ejercidos sobre el hospedante.

Entre los hongos endofíticos de raíz, algunos forman asociaciones mutualísticas, mientras que otros se comportan como patógenos. Puede considerarse un tercer grupo con papel algo más desconocido, los endofitos septados oscuros (DSE, del inglés Dark Septate Endophyte). Los hongos DSE han sido comparados con los hongos MA, por el nicho que ocupan, por algunos de los efectos que producen en los hospedantes y porque suelen encontrarse en los mismos hábitats y con un amplio rango de hospedantes. Sin embargo, mientras que en el caso de los hongos MA, existe abundante bibliografía que respalda sus características, funciones y mecanismos involucrados en la interacción con la planta hospedante, poco se sabe de los hongos DSE. Estos son ampliamente clasificados como endofitos de raíz que forman estructuras melanizadas tales como hifas inter o intracelulares y microesclerocios (Figura 1). En la mayoría de los casos pueden ser aislados y cultivados en medios de cultivo convencionales presentando hábito saprofítico (Jumpponen y Trappe 1998), en los que pueden o no producir estructuras reproductivas (Addy y col. 2005). A diferencia de las MA, que son biótrosos obligados, las que no pueden vivir sin la asociación de las plantas hospedantes.

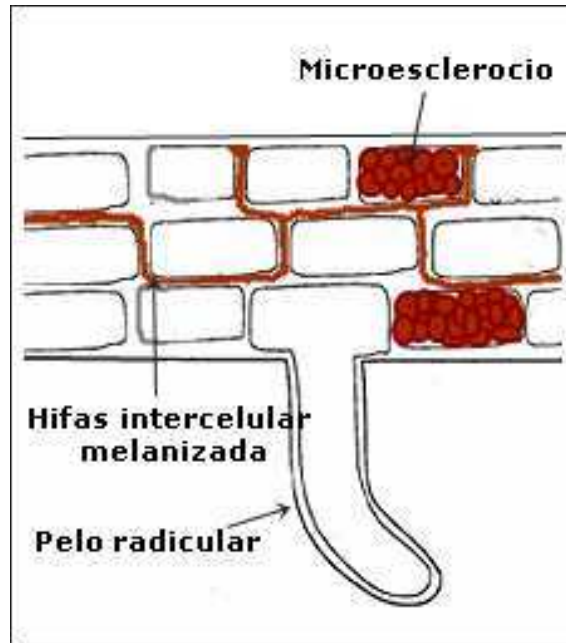


Figura 1. Esquema representativo de las estructuras típicas de los DSE en la colonización de las raíces.

Los hongos DSE colonizan una gran variedad de plantas y parecen tener una distribución mundial (Jumpponen y Trappe 1998). En una revisión realizada por Mandyam y Jumpponen (2005) acerca de su abundancia en varios ecosistemas, concluyeron que los DSE son tan abundantes como los hongos MA. Incluso se han encontrado en diversos ambientes con características extremas, desde fríos y áridos, a salinos y ácidos. Sitios en los que los hongos MA, están ausentes o en baja frecuencia (Newsham y col. 2009). Se ha sugerido que los DSE reemplazan a los hongos MA en su papel ecológico en dichos hábitats (Bledsoe y col. 1990). En ecosistemas donde estos han sido estudiados, se han encontrado generalmente colonizando una alta proporción de las plantas analizadas, y a menudo en una alta densidad (Mandyam y Jumpponen 2005). Han sido reportados en más de 600 plantas, incluso en las que son típicamente no - micorrícicas (Jumpponen y Trappe 1998). La gran abundancia y el amplio rango de hospedantes de los DSE, sugiere que cumplen un importante papel en los ecosistemas (Jumpponen y Trappe 1998).

En base a los trabajos realizados en condiciones controladas, con el objetivo de clarificar el tipo de interacción que tienen con las plantas, un meta análisis realizado por Newsham (2011) sugiere que los DSE mejoran rendimiento de la planta, sobre todo cuando, los

experimentos incluyeron N disponible en forma orgánica. Además se demostró que son capaces de producir fitohormonas como giberelinas (Hamayun y col. 2009), aumentar la tolerancia en ambientes con metales pesados (Li y col. 2011), solubilizar fósforo inorgánico (Barrow y Osuna 2002), producir metabolitos antifúngicos potencialmente como biocontroladores de enfermedades (Tellenbach y col. 2013) y otros capaces de suprimir el desarrollo de patógenos (Narisawa y col. 2002, 2004). Muchos estudios han mostrado efectos positivos de algunas de estas cepas como son la promoción del crecimiento, incrementos en pesos secos y contenido de P y de N (Barrow y Aaltonen 2001; Jumpponen y Trappe 1998; Newsham 1999). En algunos hospedantes, *Phialophora fortinii* es capaz de producir sideróforos por lo que también se ha postulado un potencial papel en la nutrición del hierro y en el biocontrol de enfermedades (Bartholdy y col. 2001). Además, el hecho de que afecten la captación de nutrientes indicaría algún papel en relación con la economía del agua y se ha sugerido que en este proceso estaría implicado un control hormonal de la fisiología del hospedante (Mandyam y Jumpponen 2005).

Por otra parte, la capacidad de producir enzimas hidrolíticas le permitirían la utilización de restos orgánicos (Mandyam y col. 2010). Poco se conoce de las implicancias de estas propiedades en la simbiosis; es decir, cuál es el grado de saprofitismo y biotrofismo de estos hongos poseen y si esta dualidad varía en función de las condiciones ambientales, las interacciones con el hospedante o de la especie de hongo DSE en cuestión.

Uno de los aspectos que ha impedido la adecuada identificación de los hongos de este grupo desde los comienzos de sus descripciones es el hecho de que no siempre se pueden identificar por medio de caracteres morfológicos, debido a la ausencia de estructuras reproductivas sexuales o asexuales. Algunos autores han propuesto condiciones de cultivo particulares que podrían inducir la formación de estructuras reproductivas (Addy y col. 2005). Sin embargo, éstas no siempre han resultado satisfactorias particularmente cuando los aislamientos se obtuvieron de diferentes regiones geográficas y pertenecen a diferentes géneros a los estudiados por los mencionados autores (Cisneros 2011; Rothen 2010). Las técnicas moleculares permitieron avanzar en las identificaciones (Menkis y col. 2004), así como en estudios de relaciones filogenéticas de este grupo (Grunig y col. 2008; Zhang y col. 2009). Según las identificaciones moleculares en general se ha podido establecer que son

hongos principalmente pertenecientes a la División Ascomycota y presentarían origen polifilético (Jumpponen 2001; Vandenkoornhuyse y col. 2002). La mayoría de los DSE indentificados hasta el momento están incluidos en los ordenes: Capnodiales, Chaetosphaeriales, Chaetothyriales, Helotiales, Leotiales, Pezizales, Pleosporales y Sordariales (Jumpponen 2001; Newsham 2011).

El taxón mas estudiado hasta el momento fue el complejo *Phialocephala fortinii* Wilcox & Wang (Grunig y col. 2008; Harney y col. 1997), un taxón con alta variabilidad genética. No se sabe si éste, representa el estado anamorfo de más de una especie teleomórfica, en cuyo caso la divergencia genética entre las cepas no sería sorprendente. *P. fortinii* tiene una distribución geográfica muy amplia, probablemente se producen en todas las zonas templadas del hemisferio norte, y no muestra especificidad por su hospedante (Ahlich y Sieber 1996; Harney y col. 1997; Jumpponen y Trappe 1998). Mientras el hongo parece ser un endofito de raíz dominante en muchos hábitats alpinos y subalpinos (Stoyke & Currah, 1991), no han sido determinados los factores ecológicos que influyen sobre la distribución, limitando nuestro entendimiento de su significado como endofito.

Haciendo referencia a los aspectos anatómicos de la interacción, las AM presentan arbusculos. Estos se desarrollan en el interior de las células corticales, siendo el lugar donde ocurre el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. La formación de los arbusculos no implica la ruptura de la membrana plasmática, esta se invagina dando lugar a la membrana peri-fúngica (Bonfante y col 1997). A diferencia de las micorrizas, los escasos estudios ultra-anatómicos realizados en los DSE, las hifas intracelulares de estos hongos no se encuentran rodeadas de dicha membrana (Peterson 2008).

Con el aumento de la investigación sobre la sistemática y relaciones filogenéticas de este grupo de hongos, sumado a la mayor disponibilidad de cultivos para los experimentos en condiciones controladas, se debe conducir a una mejor comprensión de las funciones que estos organismos desempeñan en el crecimiento de plantas (Peterson 2008).

HIPÓTESIS GENERALES

- I. Los hongos DSE constituyen un grupo altamente diverso, formado por hongos pertenecientes a diferentes taxones de la División Ascomycota. Establecer su identidad puede contribuir al conocimiento de su papel en los ecosistemas.
- II. La interacción entre los hongos DSE y su hospedante, depende de la identidad de los mismos, así como de sus capacidades para solubilizar fosfatos, producir enzimas hidrolíticas y hormonas del crecimiento.
- III. Los hongos DSE participan en la nutrición del hospedante a través de la mineralización de formas orgánicas.
- IV. Los hongos endofitos septados oscuros pueden promover el crecimiento vegetal, por lo que constituyen potenciales bio-inoculantes para el manejo sustentable de cultivos.

OBJETIVOS GENERALES

- I. Aislar e identificar los hongos endofitos septados oscuros que habitan las raíces de *G. max* y estudiar, en particular, las comunidades provenientes de suelos con distintas historias de manejo.
- II. Caracterizar los hongos DSE y analizar el tipo de interacción que establecen con su hospedante natural, *G. max*
- III. Establecer la relación entre la capacidad para utilizar fuentes nitrogenadas por los hongos endófitos septados oscuros y sus efectos sobre el crecimiento de *Glycine max*. Seleccionar cepas que favorezcan el crecimiento como consecuencia de dicha capacidad.
- IV. Establacer el potencial como bio-fertilizantes de dos endofitos seleccionados en *Glycine max* y *Triticum aestivum*

CAPÍTULO I

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y DIVERSIDAD DE HONGOS
 ENDOFITOS SEPTADOS OSCUROS DE RAÍZ**

INTRODUCCIÓN

El estudio de la diversidad de los endófitos es de inmensa importancia en la biología de las plantas para comprender y mejorar su productividad (Larran y col. 2002). Uno de los cultivos más importantes de la Argentina es *Glycine max*, no sólo por su producción, sino también por el volumen exportado (De Emilio 2015). *G. max* (soja) es una leguminosa de origen asiático cultivada en diversas partes del mundo como fuente de aceites y proteínas. En su desarrollo, según la escala de Fehr (Fehr y Caviness 1971), se describen estadios vegetativos (V) y reproductivos (R). Los estadios vegetativos se enumeran V1, V2, Vn, cuando tiene la primera, segunda, enésima hoja trifoliada totalmente desarrollada, respectivamente. Los estadios reproductivos “R” son ocho, y se agrupan de a dos, los R impares indican el comienzo del desarrollo y los R pares corresponden a pleno desarrollo. R1 y R2 indican la floración, R3 y R4 la formación de las vainas, R5 y R6 llenado de los granos y por último R7 y R8, corresponden al estado de madurez fisiológica, donde se inicia la pérdida de humedad, desencadenándose la senescencia de la planta.

Existen escasos trabajos que estudien la diversidad de hongos endófitos presentes en este cultivo. En general, la mayoría están centrados principalmente en aquellos que se comportan como patógenos (Schulz y Boyle 2005) y en menor proporción, en endofitos que colonizan la parte aérea (Impullitti y Malvick 2013; Larran y col. 2002; Pimentel y col. 2006). No se han reportado trabajos de diversidad de endofitos que colonicen la raíz.

Debido a que la gran mayoría de los hongos DSE no producen estructuras reproductivas, se ha recurrido a técnicas moleculares para su identificación. Como marcadores moleculares se utilizan las secuencias de los genes del ADN ribosomal (ADNr), que en los hongos son regiones altamente conservadas dentro de cada especie. Sin embargo, son lo suficientemente variables entre los diferentes grupos, por lo que los genes 18S, 5.8S y 28S, han sido utilizados para establecer las relaciones filogenéticas entre familias y géneros y las especies que lo conforman. De acuerdo a Edel (1998), las secuencias de las regiones intergénicas ITS son más variables ya que evolucionan más rápido que las regiones codificantes del ADNr debido a que tienen una menor presión de selección. En efecto, cualquier modificación en las

secuencias de estas regiones, no causa efectos letales sobre los organismos (Hwang y Kim 1999). Por ello, han llegado a ser una de las herramientas más empleadas en estudios filogenéticos, permitiendo la identificación y clasificación de poblaciones, además del reconocimiento de las relaciones entre especies. Dada la utilidad de estas regiones, se han desarrollado distintos primers universales especializados para su amplificación (White y col. 1990).

Los análisis moleculares pusieron en evidencia la heterogeneidad filogenética de los hongos DSE permitieron establecer su origen polifilético (Mandyam y Jumpponen 2005), sin embargo, y a pesar de su ubicuidad, se sabe relativamente poco acerca de la diversidad taxonómica (Usuky y Narisawa 2007).

Por otra parte, ante la falta de estructuras reproductivas, otra herramienta valiosa que ha facilitado la caracterización de estos hongos es la clasificación por morfotipos. Se ha observado que existe una alta correlación entre la agrupación por morfotipos y la similitud en las secuencias de ADN de los aislamientos incluidos en un mismo morfotipo (Lacap y col. 2003).

En este trabajo se examinaron las comunidades de hongos DSE asociados a raíces de *G. max* presente en dos suelos de las provincia de Buenos Aires con distinta historia de uso y en dos etapas de crecimiento del cultivo (R1 y R3), con el fin de comparar la composición de especies y establecer la diversidad de cada una de las comunidades.

HIPOTESIS PARCIALES

- Los hongos DSE se encuentran asociados a raíces de planta de *Glycine max* en agroecosistemas de la Pcia de Buenos Aires, presentando alta frecuencia y diversidad.
- La comunidad de hongos DSE en plantas de *G. max* varía en función de la historia de manejo de los suelos.
- La aplicación de estudios de filogenia para el análisis de las secuencias de ADN puede contribuir no sólo a la identificación dentro del grupo, debido a la escasa capacidad para originar estructuras reproductivas, sino también a detectar una diversidad que queda enmascarada al realizar la identificación por medio de caracteres morfológicos.

OBJETIVOS PARCIALES

- Aislar cepas autóctonas de hongos DSE a partir de plantas de *Glycine max* de Zarate, provincia de Buenos Aires, asociadas a suelos con distinta historia de manejo, y en dos estadios de crecimiento.
- Identificar dichas cepas utilizando caracteres morfológicos y moleculares.
- Establecer la diversidad y comparar la estructura de las comunidades de estos endofitos, asociados a *Glycine max*, dadas por la etapa de crecimiento y la historia del suelo del que fueron aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO

El sitio de muestreo se encuentra ubicado en las cercanías de Puente Castex, Zárate, ($34^{\circ}08'38,4''S$ - $59^{\circ}16'44''O$), una zona ubicada en la pampa ondulada, en el Noroeste de la provincia de Buenos Aires (Figura I-1). En donde la modificación de la cobertura vegetal nativa es casi completa, debido a las actividades productivas. Gracias a sus condiciones edáficas y a su clima, predominantemente templado y húmedo, esta zona tiene un carácter eminentemente agrícola. Las áreas utilizadas para la ganadería se encuentran adyacentes a los cursos de agua y en zonas cóncavas anegables. Los suelos son profundos y bien drenados, con una textura franco-limosa (Fucks y col. 2011).



Figura I 1 Figura I-1 Mapa de la provincia de Buenos Aires indicando la ubicación del sitio de muestreo (Partido de Zárate) y en detalle las dos parcelas seleccionadas (CA: Campo Agrícola y BA: Bañado Agrícola).

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se seleccionaron dos parcelas (de 5 x 25 metros) contiguas, de suelos con cultivo extensivo de *Glycyne max*, con diferente historia de manejo. Una de las parcelas tiene más de veinte años de rotación soja-trigo y es la que llamamos Campo Agrícola (CA). La otra ha sido incorporada recientemente a la agricultura extensiva y presenta solamente dos años de monocultivo de *G. max*, es la que llamamos Bañado Agrícola (BA) (Figura I-1). Previamente, esta parcela estuvo destinada a la cría de ganado bovino con pastura natural, la que presentaba como especie forrajera predominantemente *Rye grass*.

Se realizaron muestreos en dos etapas del desarrollo de la planta (Figura I-2). El primero de ellos en noviembre de 2011, correspondiente a la finalización de la etapa vegetativa e inicio de la floración (R1), treinta días después de la siembra, y el segundo, tres meses después del primer muestreo, en plenitud de formación de las vainas (R3) (Fehr y Caviness 1971). En cada muestreo se recolectaron 23 plantas al azar de cada parcela (CA y BA). Con el fin de evitar lesiones en las raíces, se realizó una perforación que delimitó un cilindro en el suelo rodeando a la raíz y se retiró la planta junto con el suelo circundante. Las plantas colectadas fueron embolsadas en forma individual y luego rotuladas adecuadamente para su transporte. Se mantuvieron refrigeradas hasta el momento en el que fueron procesadas, período que no superó las 12 hr.

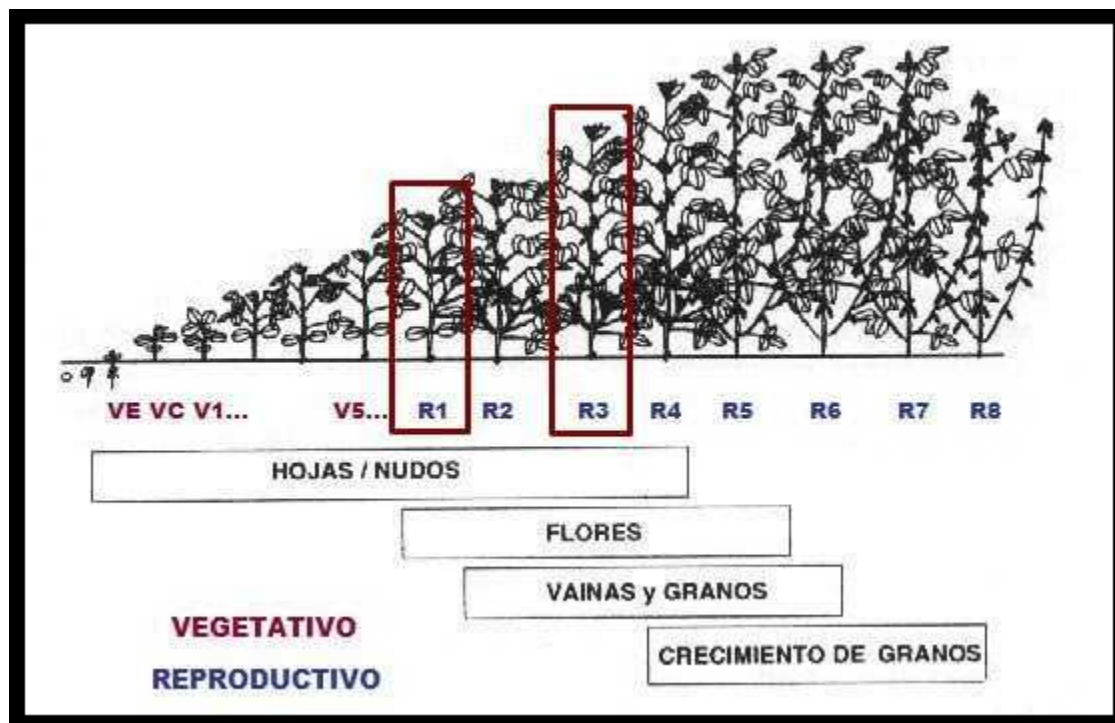


FIGURA I 2 Estados fenológicos de *G. max*. Se distinguen dos etapas principales. La etapa vegetativa (V) y la reproductiva (R), determinadas por la presencia o ausencia de estructuras de reproducción. Los muestreos fueron realizados en las etapas R1 y R3, tal como se indica.

AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOFITOS DE RAÍZ

En el laboratorio, las raíces fueron separadas del resto de la planta y lavadas con abundante agua corriente. De cada raíz, se seleccionaron al azar, cinco fragmentos correspondientes a raíces laterales, de aproximadamente 5 cm de longitud, los cuales fueron esterilizados superficialmente. Antes, y para disminuir la tensión superficial, la raíz fue sumergida unos segundos en una solución de EtOH 70%.

ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL

En primer lugar se realizó un lavado con agua destilada estéril durante 15 segundos en agitación; luego, se colocó en una solución de NaOCl 10% por 15 min, seguido de 15 min en una solución de antibiótico (0,05% p/v de Penicilina, 0,05% p/v de Ampicilina, 0,05% p/v de Estreptomicina y 0,05% p/v de Tetraciclina). Para finalizar, se realizaron tres lavados con

agua destilada estéril. Los fragmentos de raíz esterilizados se reservaron en cajas de Petri con papel de filtro estériles con el fin de eliminar el agua excedente.

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL AISLAMIENTO

De cada uno de los fragmentos esterilizados, se cortaron 5 sub-fragmentos consecutivos (de ≈ 4 mm), descartando los extremos. Se sembraron en gotas de Agar Agua (0,35 % p/v Gel-Gro® y 0,03% MgSO₄, pH 6) en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (Silvani y col., 2008).

Los sub-fragmentos correspondientes a una misma planta fueron sembrados en la misma caja de Petri (Figura I-3), las cuales se dividieron en cinco partes; en cada una de las partes, se colocaron los sub-fragmentos consecutivos. Se incubaron a 25°C y se revisaron periódicamente en busca de la presencia de hifas creciendo a partir del interior de cada trozo de raíz.

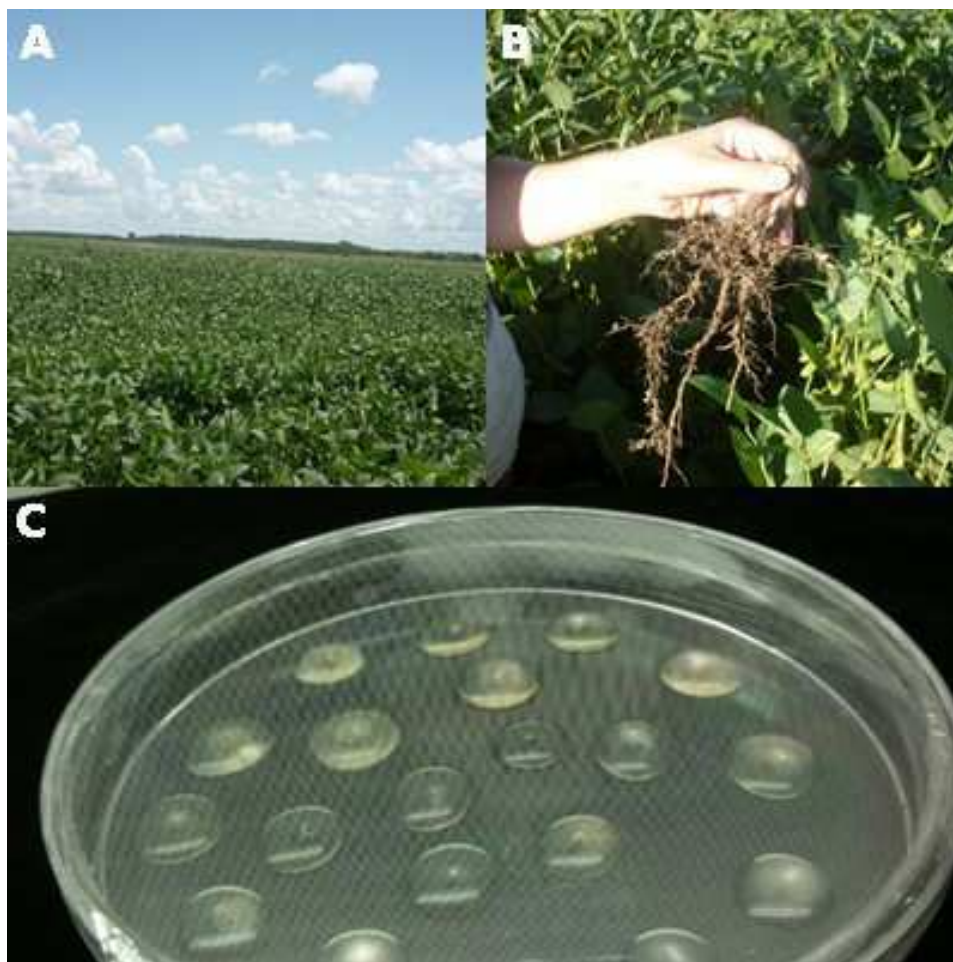


Figura I 3. A, sitio de muestreo con cultivo de *Glycine max*. B, raíz de *G. max*. C, modelo de caja de petri en donde se realizó el aislamientos de los endofitos.

En síntesis, se procesaron 23 plantas de cada parcela en cada estado fenológico: Campo Agrícola-inicio de la floración (CA R1), Campo Agrícola-formación de vainas (CA R3), Bañado Agrícola-inicio de la floración (BA R1) y Bañado Agrícola- formación de vainas (BAR3) y de cada planta se sembraron veinticinco fragmentos.

Conforme se fueron observando hifas creciendo desde el interior de los fragmentos de raíz, éstos fueron gradualmente transferidos a Agar Extracto de Malta (AEM) en cajas de Petri de 5 cm de diámetro, las que se incubaron en oscuridad a 25°C. Se controló en forma periódica el crecimiento de las colonias y en los casos en los que se desarrolló más de una, se realizaron los repiques necesarios hasta conseguir cultivos puros. Se continuó trabajando

solamente con los aislamientos que originaron colonias oscuras, algunos presentaron pigmentación desde el principio y otros se fueron pigmentando progresivamente.

CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS FÚNGICOS

Una vez obtenidos los cultivos puros, se conservaron en tubos pico de flauta con AEM a 4°C y en tubos eppendorf con 1 ml de solución de glicerol en agua (20%) y 500 µl del cultivo fúngico crecido en Caldo Extracto de Malta (CEM), en freezer a -80 °C.

CARACTERIZACIÓN POR MORFOTIPOS

En base al aspecto de las colonias y la velocidad de crecimiento de los cultivos fúngicos, los aislamientos obtenidos fueron agrupados en diferentes morfotipos (Lacap y col.. 2003). Se sembraron tres réplicas de cada aislamiento en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con AEM. El crecimiento fue determinado midiendo el diámetro de la colonia en cm a los cinco días del cultivo. Otras características que se tuvieron en cuenta fueron el color de la colonia (anverso y reverso), elevación (plana, cóncava o convexa), textura (semejante a un fieltro, terciopelada, pulverulenta, con escaso micelio aéreo), tipo de micelio (aéreo o inmerso), forma del margen (entero o crenado) y densidad (baja, media o alta).

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los aislamientos que dieron origen a estructuras reproductivas fueron identificados a nivel de especie, en base, principalmente, a la morfología de la colonia, de los conidios y conidióforos (Domsch y col. 1980; Ellis 1971; Woudenberg y col. 2013).

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Debido a que la mayoría de los hongos de este grupo de endofitos presenta escasa capacidad reproductiva en cultivo y, con el fin de conocer las afinidades taxonómicas de todos los aislamientos, se realizó la identificación molecular de los mismos. Para ello, se extrajo ADN genómico a partir de cultivos de una semana de cada uno de los aislamientos crecidos en CEM a 25°C durante una semana, siguiendo el protocolo del kit de extracción

UltraClean™ Microbial Isolation Kit (MO BIO). Se amplificó la región ITS del ADNr por PCR, utilizando los primers ITS4 e ITS5 (White y col. 1990). La mezcla de reacción contuvo en 50 μ l de volumen final, 1 μ l de 10 mM dNTP, 10 μ l de 10 \times Iproof buffer, 0.5 μ l de 100 μ M primers, 0.5 μ l de 1.5 unit iProof™ High Fidelity DNA Polymerase (BIO RAD) y 2 μ l de ADN genómico. El programa para las reacciones de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización a 98°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 seg, apareamiento a 54°C por 30 seg, extensión a 72°C por 20 seg, y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO BIO) y secuenciados en el servicio de Secuenciación y Genotipificado del Departamento de Ecología y Evolución (FCEN, UBA), con los primers ITS4 e ITS5. La Secuenciación de Sanger fue realizada en un secuenciador ABI 3130xl 16-capillary mediante el uso de la química Big Dye 3.1.

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias presentes en el MycoBank (<http://www.mycobank.org>) con la herramienta de Alineamiento de secuencias de ADN en línea, la que arroja el porcentaje de similitud y cobertura con secuencias de varias bases de datos de hongos. Posteriormente se realizó la búsqueda de secuencias para realizar los análisis filogenéticos moleculares (Aveskamp y col. 2010; de Gruyter y col. 2013; Hyde y col. 2013). Las secuencias fueron alineadas con el ClustalW2, asignando un costo de 15 a la apertura y 6 a la extensión de los gaps. Con la matriz que se obtuvo luego del alineamiento, se calculó el modelo evolutivo y los análisis filogenéticos con el método basado en “el vecino más cercano” usando el programa MEGA versión 6.0 (Tamura y col. 2013). El soporte de los nodos obtenidos, fue calculado mediante el análisis de Bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein 1985).

ANÁLISIS ECOLÓGICOS

Para comparar la estructura de las cuatro comunidades de hongos endofíticos en estudio (CA R1, CA R3, BA R1 y BA R3) se consideraron los componentes alfa y beta. La diversidad

alfa permite realizar un análisis a escala de comunidad y la beta compara diferentes comunidades (Whittaker 1972).

DIVERSIDAD ALFA

La diversidad de especies se estimó en términos de riqueza y equitatividad, a través de los índices de Gleason (Groth y Roelfs 1987) y de Shannon-Wiener. El primero considera sólo la riqueza específica, mientras que el segundo tiene en cuenta ambos aspectos, dando información independientemente del tamaño de la muestra considerada (Poole, 1974). También se determinó el índice de Simpson (D). Éste es sensible a la abundancia de una o dos de las especies más comunes de una comunidad (Simpson 1949). Su valor oscila entre 0 y 1, valores cercanos a cero indican que la comunidad es diversa, es decir, las especies presentes se encuentran igualmente representadas, en tanto que valores cercanos a 1 indican la existencia de especies dominantes y diversidad baja.

A continuación, las fórmulas correspondientes a cada uno de los índices considerados:

$$\text{Gleason} \quad G = Np - (1/\ln Ni)$$

$$\text{Shannon – Wiener} \quad S = -\sum_j (P_j \ln P_j)$$

$$\text{Simpson} \quad D = \sum_j (P_j^2)$$

N_i =número de aislamientos

N_p =número de especies identificadas

P_j =proporción de aislamientos de esa especie

DIVERSIDAD BETA

Para comparar el grado de similitud de las comunidades, se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard. Éste tiene en cuenta la cantidad de especies presentes exclusivamente en cada una de ellas y la cantidad de especies comunes (Arnold y col. 2000).

$$\text{Coeficiente de similitud de Jaccard} \quad J = \frac{C}{a+b-c}$$

a= Número de especies presentes sólo en la comunidad A

b=Número de especies presentes sólo en la comunidad B

c=Número de especies presentes en ambos sitios A y B

El intervalo de valores para este índice va desde 0 cuando no hay especies compartidas entre ambas comunidades, hasta 1 cuando los dos sitios tienen la misma composición de especie.

La composición de los medios utilizados se encuentra detallada en el Anexo.

RESULTADOS

AISLAMIENTOS FÚNGICOS

Fueron obtenidos un total de 168 aislamientos, de los cuales 60 pertenecieron a las muestras colectadas en noviembre y 126 a las colectadas en febrero, las que corresponden a los estados fenológicos R1 y R3 de *G. max*. La Figura I-4 muestra que el número de aislamientos varió principalmente en función de la etapa de desarrollo en la que se encontraba el cultivo, en comparación con la historia de manejo de los suelos de origen (CA y BA). Efectivamente, como se observa en la Figura I-4, para ambos sitios el número de aislamientos fue menor en la etapa de inicio de la floración (R1), que en la etapa reproductiva (R3), en la que además, la cantidad de aislamientos de CA fue mayor. En cuanto a las características fenotípicas de los aislamientos, la cantidad de hongos dematiáceos fue similar en los dos estados fenológicos, pero éstos corresponden sólo al 36% y al 19% del total de los aislamientos totales obtenidos en cada etapa (Figura I-5).

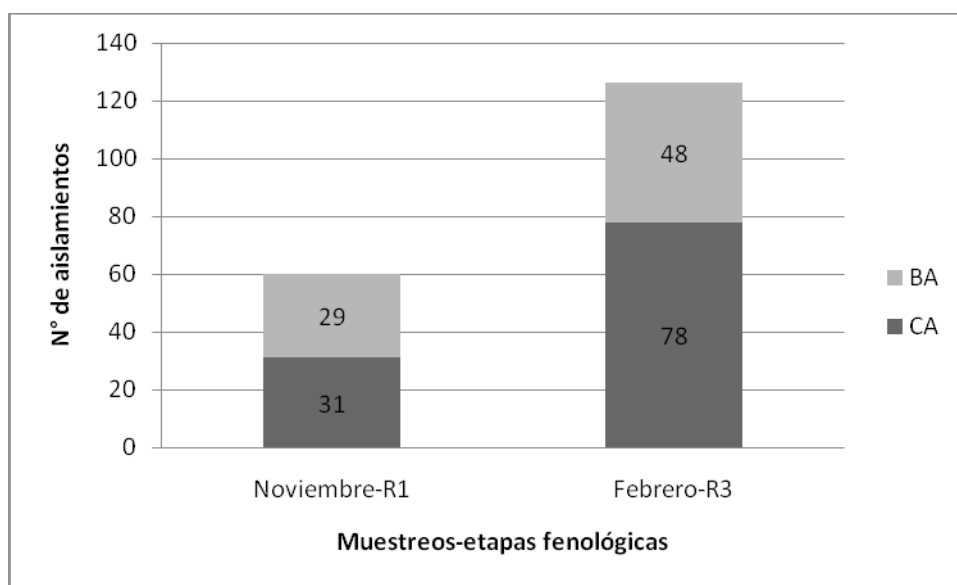


FIGURA I 4 Número de aislamientos totales obtenidos en cada uno de los sitios de muestreo: Campo agrícola (CA) y Bañado Agrícola (BA), en las dos etapas fenológicas (R1 y R3).

En las siguientes etapas de este trabajo, se conservaron únicamente los 47 aislamientos de hongos dematiáceos obtenidos. En la Figura I5 se representó el número de aislamientos dematiáceos obtenidos de cada comunidad.

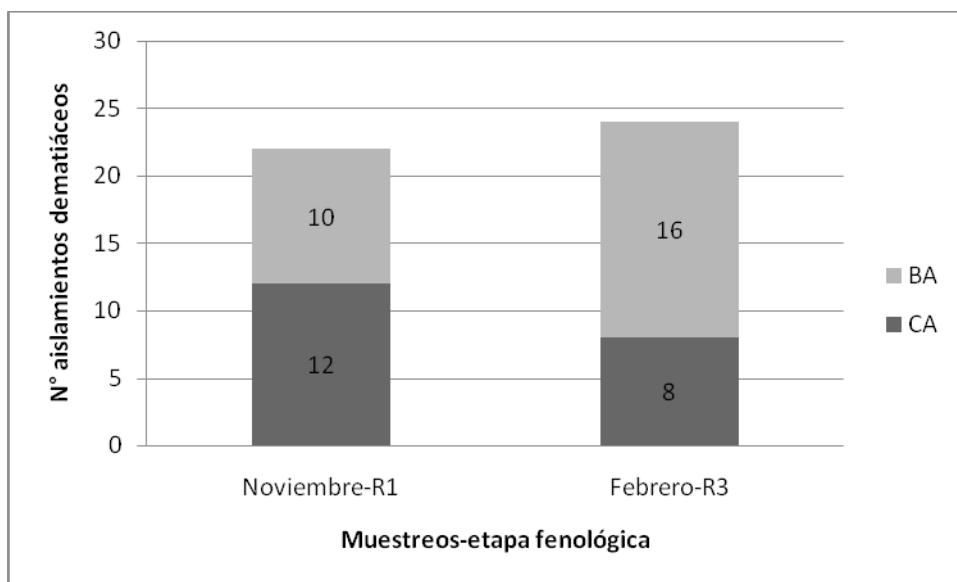


Figura I 5 Número de aislamientos dematiáceos obtenidos en cada uno de los sitios de muestreo, Campo Agrícola (CA) y Bañado Agrícola (BA), en las dos etapas fenológicas (R1 y R3).

IDENTIFICACIÓN

Del total de aislamientos obtenidos, 5 se identificaron únicamente por caracteres morfológicos, 12 sólo por caracteres moleculares y 23 por ambos, mientras que 7 de los aislamientos permanecieron como micelio estéril y no se logró obtener su secuencia para la identificación molecular. Los aislamientos que pudieron ser identificados morfológicamente pertenecieron a las siguientes especies: *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens*, *Curvularia trifolii*, *Corynespora cassicola*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Macrophomina phaseolina*, *Monodyctis* sp., *Humicola grisea*, *Humicola fuscoatra* y *Chaetomium* sp., los que en su mayoría fueron confirmados por análisis filogenéticos. Entre los aislamientos que fueron identificados únicamente por caracteres moleculares se encontraron *Paraphoma*

radicina, *Phaeosphaeria* sp., *Alternaria* spp., *Boeremia* sp. y *Peyronellae* sp. Los aislamientos que no pudieron ser identificados por ninguna de las dos técnicas, fueron clasificados y agrupados en morfotipos en función de las características de las colonias y su velocidad de crecimiento. En la Tabla I-1 se describen los morfotipos correspondientes a cultivos en AEM a 25°C.

Tabla I-1. Características de los morfotipos correspondientes a los aislamientos que no fueron identificados taxonómicamente.

| Morfotipo | Diám. a los 6 días | Forma | Color anverso | Color reverse | Elevación | Textura | Micelio | Borde | Densidad |
|-----------|--------------------|-------------|---------------|---------------|-----------|----------------------|---------|---------|----------|
| 1 | 0,8 cm | Circular | Marrón claro | Marrón oscuro | Convexo | Fieltro | Aéreo | Entero | Denso |
| 2 | 0,8 cm | Circular | Gris-verde | Negro | Chato | Fieltro | Inmerso | Entero | Denso |
| 3 | 0,8 cm | Irregular | Marrón claro | Marrón oscuro | Convexo | Fieltro | Aéreo | Crenado | Denso |
| 4 | 0,8 cm | Irregular | Gris-verde | Marrón | Elevado | Fieltro | Inmerso | Crenado | Denso |
| 5 | 1,2 | Circular | Gris-verde | Marrón | Elevado | Fieltro | Inmerso | Crenado | Denso |
| 6 | 2 cm | Circular | Crema | Crema | Chato | Escaso micelio aéreo | Inmerso | Entero | Media |
| 7 | 2,4 cm | Filamentoso | Marrón-verde | Negro | Chato | Fieltro | Aéreo | Entero | Medio |

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Se amplificó la región que codifica para la subunidad menor del ribosoma (5.8S), la que incluye los espacios intergénicos ITS1 e ITS2, para 30 de los aislamientos.

De las comparaciones realizadas en el MycoBank se obtuvo la similitud y el porcentaje de cobertura de las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos. Hubo casos en los que los resultados derivaron en una única especie, como es el caso de *Corynespora cassicola* y *Macrophomina phaseolina*, mientras que en otros, los resultados fueron más ambiguos. Éste es el caso de *Paraphoma radicina*, *Phaeosphaeria* sp., *Coniothyrium cerealis*, *Peyronellae* sp., *Boeremia* sp., *Curvularia trifolii* y *Alternaria* spp., los que en sumatoria resolvieron luego de los análisis filogenéticos. Éstos permitieron obtener hipótesis para establecer las relaciones taxonómicas entre los aislamientos con resultados ambiguos y, junto con los caracteres morfológicos permitieron su clasificación a nivel de especie o de

género. En la Figura I-6 se puede observar el árbol que incluye todos los análisis realizados, en el que se separaron cinco clados, los que más adelante serán expuestos en detalle.

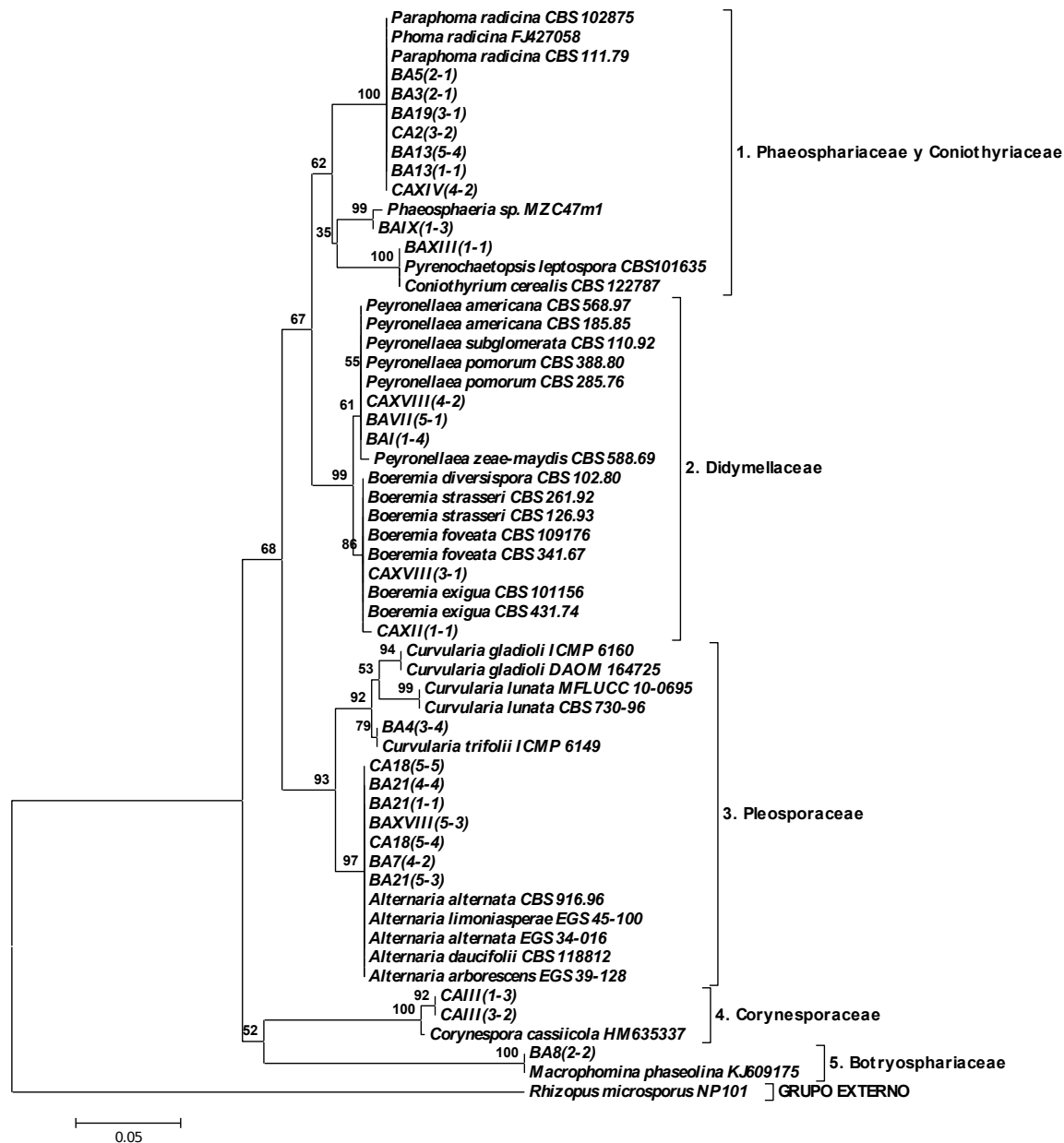


Figura I-6: Árbol filogenético construido con NJ-Vecino más cercano (Neighbour Joining) de aislamientos de endofitos dematiáceos de *G. max* basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: Jukes-Cantor (JC). En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: *Rhizopus microsporus* (Zygomycete).

El clado 1 incluye hongos pertenecientes a las familias Phaeosphaeriaceae y Coniothyriaceae. En la figura I-7 se expone el árbol filogenético correspondiente a este clado

en el que ocho de los aislamientos se agrupan con un integrante de la familia Phaeosphaeriaceae: *Paraphoma radicina* con soporte del 99 y secuencias con 99% de homología. El segundo grupo incluido en esta familia corresponde a *Phaeosphaeria* sp., con el que el aislamiento BA IX 1-3 se agrupó con 99 de soporte. El tercer grupo del clado 1 incluye a *Coniothyrium cerealis* y *Pirenochaetopsis leptospora*, pertenecientes a la familia Coniothyriaceae, el aislamiento presento igual similitud con ambas especies.

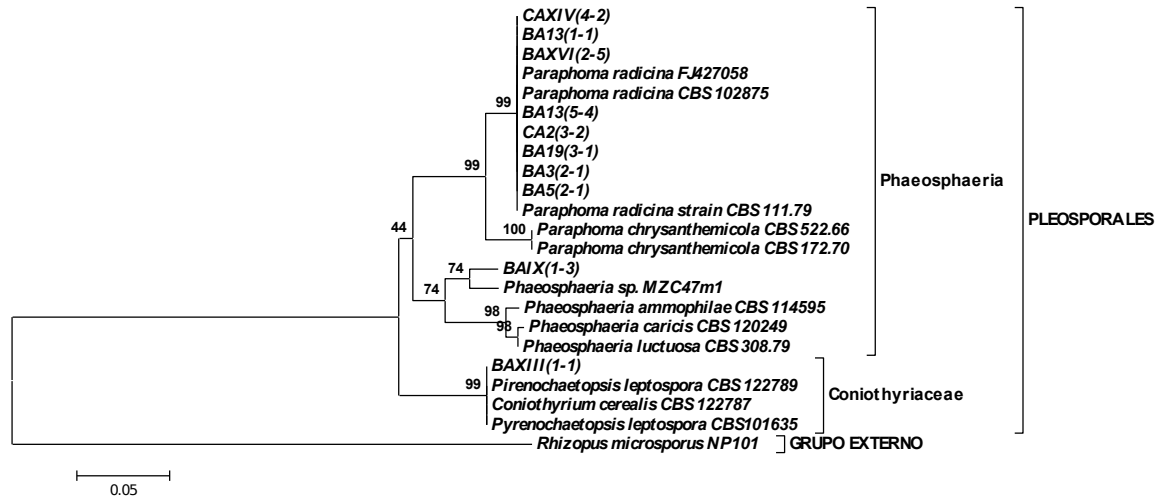


Figura I-7: Árbol filogenético construido con NJ de aislamientos de endofitos dematiáceos de *G. max* correspondientes al clado 1 descrito, basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: JC. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: *Rhizopus microsporus* (*Zygomycete*).

El clado 2 incluye dos géneros de la familia Didymellaceae, cada uno formando un grupo monofilético (Figura I-8): el género *Boeremia*, ya que dos de los aislamientos fueron incluidos en este grupo, y el género *Peyronellae*, en el que se incluyeron tres de los aislamientos. En ambos casos la variabilidad en las secuencias analizadas es muy baja, lo que impide resolver a nivel de especie.

El clado 3 (Figura I-9) representa a la familia Pleosporaceae, en donde las secuencias se agruparon con dos géneros de esta familia, que formaron dos grupos, uno corresponde a *Curvularia* y el otro a *Alternaria*. En el primer caso, uno de los aislamientos se agrupó con un soporte de 99 a *Curvularia trifolii*.

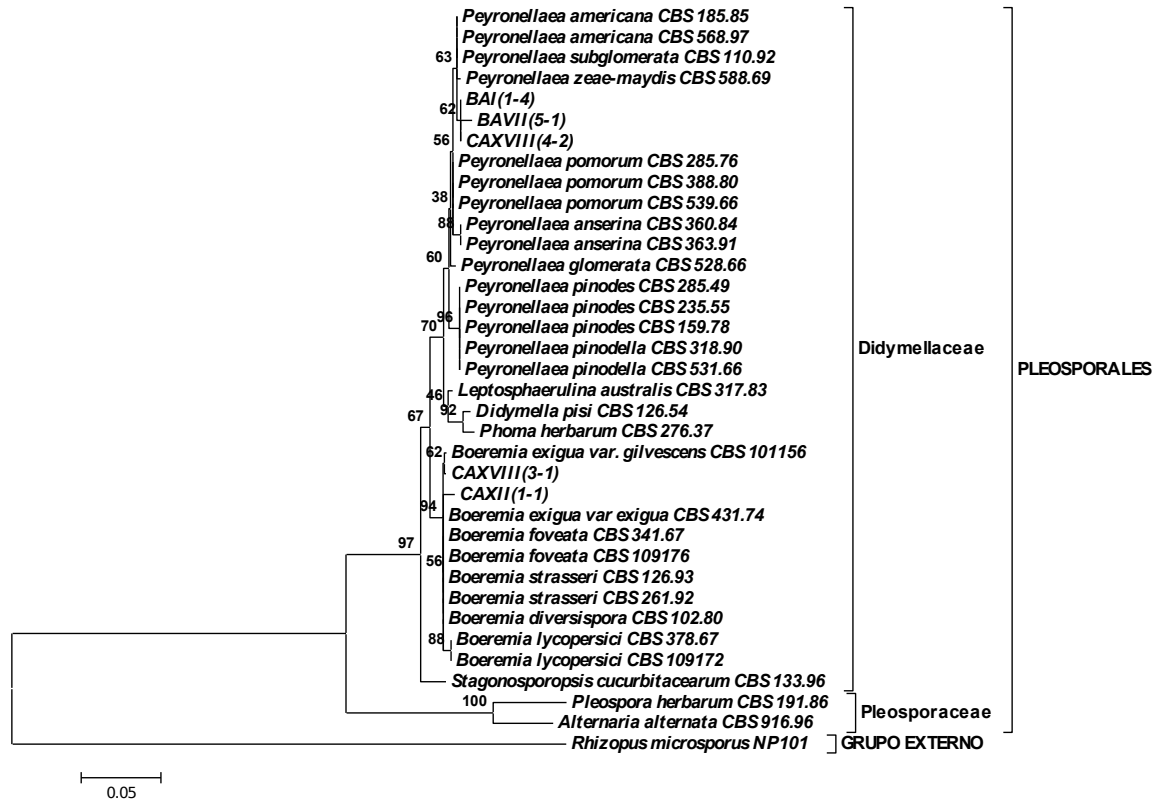


Figura I-8: Árbol filogenético construido con NJ de aislamientos de endofitos dematiáceos de *G. max* del clado 2, basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: JC. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: *Rhizopus microsporus* (*Zygomycete*).

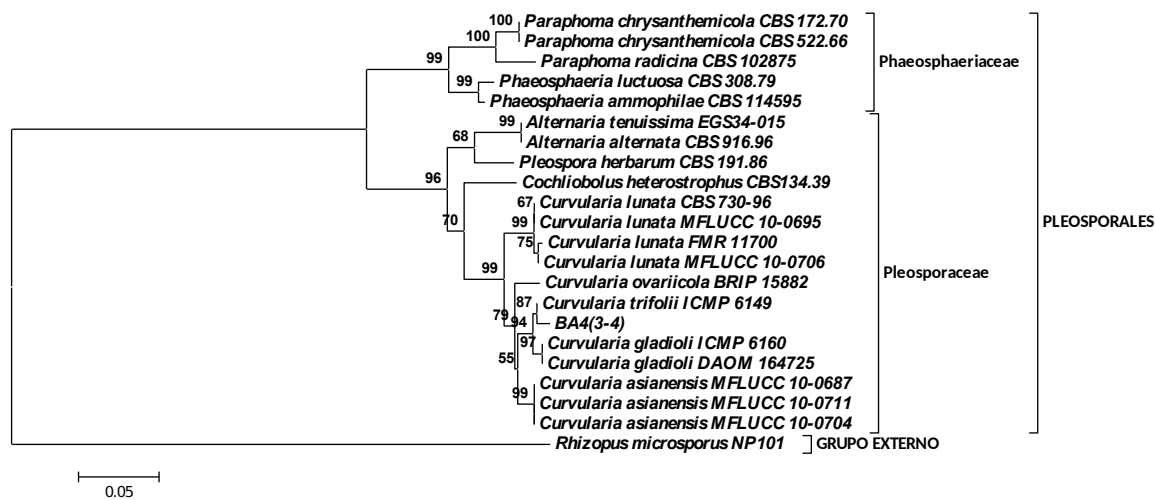


Figura I-9: Árbol filogenético construido con NJ de aislamientos de endofitos dematiáceos de *G. max* correspondientes al clado 3, basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: JC. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: *Rhizopus microsporum* (Zygomycete).

En los clados 4 y 5 (Figura I-6), donde en el primer grupo se encuentra la familia Corynesporaceae, las secuencias de dos aislamientos presentaron alta similitud y se agruparon con 99 de soporte con *Corynespora cassicola* y en el otro se separó un representante de la familia Botryosphaeriaceae, *Macrophomina phaseolina*, el que se agrupó con 99 de soporte con la secuencia de uno de los aislamientos. En ambos casos, la comparación con secuencias del Mycobank arrojó resultados certeros, además ambos fueron confirmados por caracteres morfológicos. A continuación, en la Tabla I-2, se presenta la lista de las especies identificadas y el porcentaje de aparición entre los aislamientos dematiáceos obtenidos.

Tabla I-2. Aislamientos de hongos dematiáceos que fueron identificados por caracteres morfológicos y/o moleculares, agrupados en función de su clasificación taxonómica. El porcentaje de aparición calculado incluye a los micelios estériles, aunque éstos no fueron incluidos en esta tabla.

| Clase | Orden | Familia | Género/especie | Número de aislamientos | % del total de aparición |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Dothideomycetes | Pleosporales | Phaeosphaeriaceae | <i>Paraphoma radicina</i> | 8 | 17,02 |
| | | | <i>Phaeosphaeria sp.</i> | 1 | 2,13 |
| | | Cucurbitariaceae | <i>Coniothyrium cereals</i> | 1 | 2,13 |
| | | Pleosporaceae | <i>Alternaria alternata</i> | 10 | 21,28 |
| | | | <i>Alternaria arborecens</i> | 3 | 6,38 |
| | | | <i>Alternaria sp 1</i> | 1 | 2,13 |
| | | | <i>Alternaria sp 2</i> | 1 | 2,13 |
| | | | <i>Alternaria sp 3</i> | 1 | 2,13 |
| | <i>Curvularia trifolii</i> | 1 | 2,13 | | |
| | Didymellaceae | <i>Boeremia sp.</i> | 2 | 4,26 | |
| | | <i>Peyronellae sp.</i> | 3 | 6,38 | |
| | Corynesporaceae | <i>Corynespora cassicola</i> | 2 | 4,26 | |
| Capnodiales | Cladosporaceae | <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | 1 | 2,13 | |
| Botryosphaeriales | Botryosphaeriaceae | <i>Macrophomina phaseolina</i> | 1 | 2,13 | |
| Incierto | Incierto | <i>Monodyctis sp.</i> | 1 | 2,13 | |
| Sordariomycetes | Sordariales | Chaetomiaceae | <i>Humicola grisea</i> | 1 | 2,13 |
| | | | <i>Humicola fuscoatra</i> | 1 | 2,13 |

| | | | | | |
|--|--|--|-----------------------|---|------|
| | | | <i>Chaetomium sp.</i> | 1 | 2,13 |
|--|--|--|-----------------------|---|------|

ANÁLISIS ECOLÓGICOS

DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES DE HONGOS DEMATIÁCEOS (COMPONENTE ALFA)

Para caracterizar y comparar las comunidades en estudio calculamos el índice de Gleason (G), el índice de Shannon-Wiener (S) y el índice de Simpson, cuyos valores correspondientes a cada comunidad pueden observarse en la Tabla 3.

El índice de Gleason tiene en cuenta únicamente la riqueza de especies, la riqueza de los suelos CA (CA R1 y CA R3) fue menor (7,6 y 4,52 respectivamente) que la de los suelos BA, esa diferencia se ve muy pronunciada en la etapa R3, donde el valor de G difiere significativamente del resto.

Tabla I-3. Riqueza específica (G), Equitatividad (S) y Diversidad (D) de las comunidades de hongos dematiáceos aislados de las raíces de *G. max*, prueba t entre riqueza de especies, equitatividad y diversidad, en función de las cuatro comunidades (BA R1, CA R1, BA R3 y CA R3). Significancia $P < 0.05$ indicadas con letras distintas.

| COMUNIDADES | BA R1 | CA R1 | BA R3 | CA R3 | Prueba t |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|----------|
| Gleason | 8,57 a | 7,60 a | 7,64 a | 4,52 b | 0,0040 |
| Shannon – Wiener | 2,16 a | 2,14 a | 1,77 b | 1,39 b | 0,0020 |
| Simpson | 0,88 a | 0,88 a | 0,78 b | 0,69 b | 0,0004 |

En cuanto a los valores del índice de Shannon-Wiener, que considera tanto a la riqueza como a la equitatividad de una comunidad, las comunidades BA y CA en la etapa fenológica R3 presentaron valores significativamente menores (1,77 y 1,39 respectivamente) a los valores observados para el estadio R1. Esto indica que las especies se encuentran desigualmente representadas durante la etapa R1 en comparación a las comunidades de la etapa fenológica R1 (Figura I-(10-13)). El mismo patrón fue encontrado al calcular el índice de Simpson, en donde las dos comunidades de la etapa fenológica R3 (BA R3 y CA R3) presentaron valores significativamente menores (0,78 y 0,69 respectivamente).

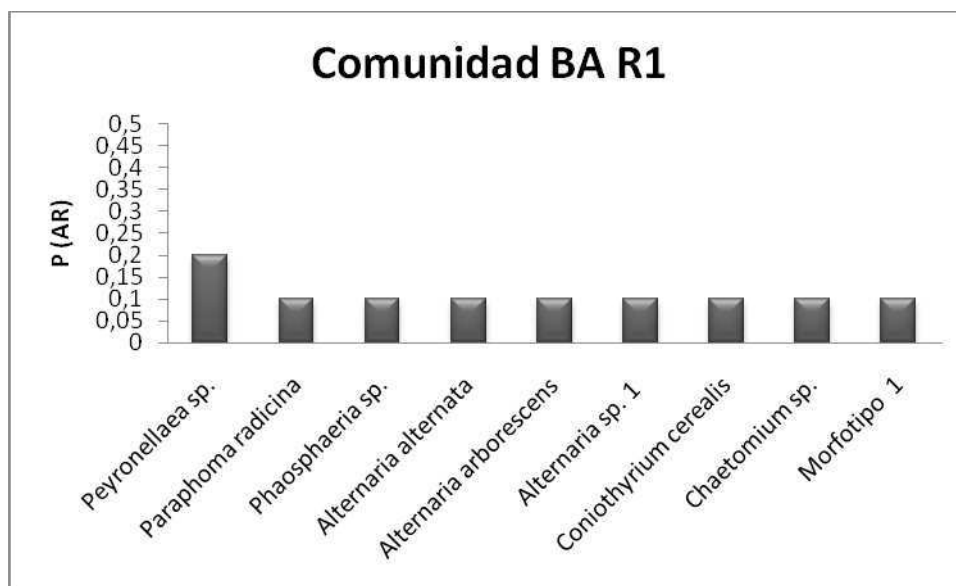


Figura I-10. Abundancia relativa de las especies de la comunidad BA R1.

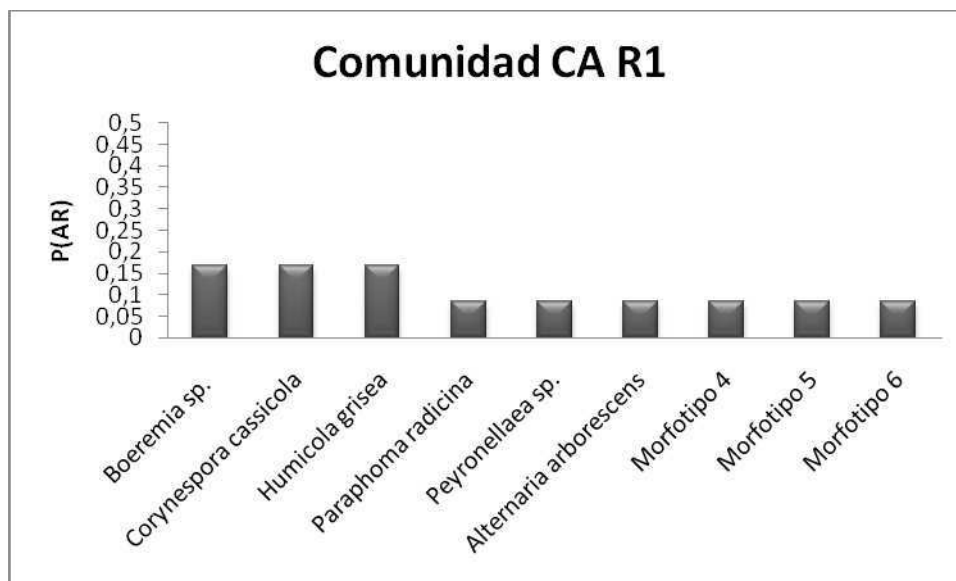


Figura I-11. Abundancia relativa de las especies de la comunidad CA R1.

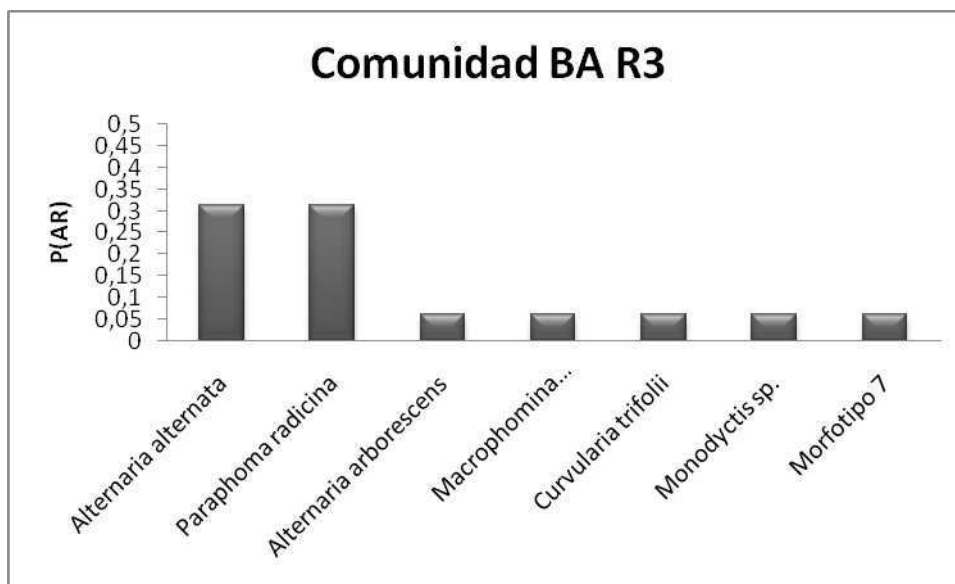


Figura I-12. Abundancia relativa de las especies de la comunidad BA R3.

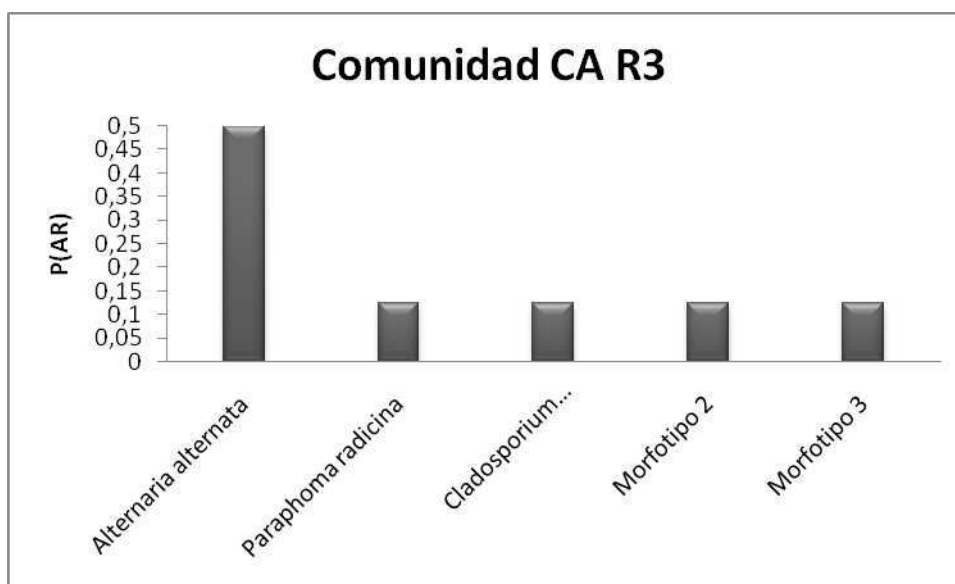


Figura I-13. Abundancia relativa de las especies de la comunidad CA R3.

COMPARACIÓN ENTRE LAS COMUNIDADES DE HONGOS DEMATIÁCEOS
(COMPONENTE B)

Para comparar las comunidades se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard. La tabla I-4 muestra las comparaciones realizadas y el valor que tomó este índice para cada una.

Tabla I-4. Comparación entre comunidades de hongos dematiáceos presentes en las raíces de *G. max*, con el coeficiente de similitud de Jaccard.

| Comparación | Coeficiente de similitud de Jaccard | |
|--------------------------|-------------------------------------|------|
| Entre suelos | BA R1- CA R1 | 0,6 |
| | BA R3- CA R3 | 0,28 |
| Entre etapas fenológicas | BA R1- BA R3 | 0,6 |
| | CA R1- CA R3 | 0,1 |

Por un lado, las comparaciones realizadas entre los dos suelos y para cada etapa fenológica (R1 y R3) mostraron diferencias significativas (0,6 y 0,28 respectivamente), lo que indica que las comunidades BA R1 y CA R1 son más similares que las comunidades BA R3 y CA R3. Como se puede observar en la tabla I-5, donde se muestra la lista de especies discriminadas por comunidad, en la etapa R3 existe una dominancia de *Alternaria alternata* y *Paraphoma radicina* principalmente en el suelo BA. Por otro lado las comparaciones realizadas entre las etapas fenológicas de un mismo suelo, las comunidades BA R1 y BA R3 mostraron mayor similitud que las comunidades CA R1 y CA R3 (0,6 y 0,1 respectivamente). El suelo BA, en sus dos etapas cuenta con la presencia *Alternaria alternata* y *Paraphoma radicina*, aunque en diferente frecuencia, y el número de especies no compartidas es menor que el valor correspondiente a la comunidades del suelo CA.

Tabla I-5. Porcentajes de aparición de cada una de las especies de hongos DSE aisladas a partir de *G. max* discriminadas según las comunidades de origen: Bañado Agrícola y Ccampo Agrícola (BA y CA), suelos con distinta historia de manejo y estado fenológico (R1 y R3).

| Aislamientos dematiáceos (% del total) | BA | | CA | |
|--|-----|------|-----|-----|
| | R1 | R3 | R1 | R3 |
| <i>Paraphoma radicina</i> | 4,3 | 10,6 | 2,1 | 2,1 |
| <i>Phaeosphaeria sp.</i> | 2,1 | - | - | - |
| <i>Coniothyrium cereals</i> | 2,1 | - | - | - |
| <i>Alternaria alternate</i> | 2,1 | 14,9 | - | 4,3 |
| <i>Alternaria arborecens</i> | 2,1 | 2,1 | 2,1 | - |
| <i>Alternaria sp 1</i> | 2,1 | - | - | - |
| <i>Alternaria sp 2</i> | - | - | - | 2,1 |
| <i>Alternaria sp 3</i> | - | - | - | 2,1 |
| <i>Curvularia trifolii</i> | - | 2,1 | - | - |
| <i>Boeremia sp.</i> | - | - | 4,3 | - |
| <i>Peyronellae sp.</i> | 2,1 | - | 4,3 | - |
| <i>Corynespora cassicola</i> | - | - | 4,3 | - |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | - | - | - | 2,1 |
| <i>Macrophomina phaseolina</i> | - | 2,1 | - | - |
| <i>Monodyctis sp.</i> | - | 2,1 | - | - |
| <i>Humicola grisea</i> | - | - | 2,1 | - |
| <i>Humicola fuscoatra</i> | - | - | 2,1 | - |
| <i>Chaetomium sp.</i> | 2,1 | - | - | - |
| micelio estéril 1 | - | - | 2,1 | - |
| micelio estéril 2 | - | - | 2,1 | - |
| micelio estéril 3 | - | - | 2,1 | - |
| micelio estéril 4 | - | - | - | 2,1 |
| micelio estéril 5 | - | - | - | 2,1 |
| micelio estéril 6 | 2,1 | - | - | - |
| micelio estéril 7 | - | 2,1 | - | - |

DISCUSIÓN

Las interacciones hongo-planta no patogénicas, han adquirido gran importancia en las últimas décadas, particularmente en el caso de los endofitos septados oscuros (Addy y col. 2005; Jumpponen y Trappe 1998). En este capítulo se estudió la composición de las comunidades de hongos DSE presentes en las raíces de *G. max* en dos etapas de crecimiento y provenientes de dos suelos con distinta historia de manejo.

El aislamiento a partir de raíces de *G. max* permitió obtener hongos dematiáceos que crecieron desde el interior de las raíces, de los cuales, la mayoría (85%) pudieron ser identificados taxonómicamente utilizando caracteres morfológicos y/o moleculares. De éstos, el 82% pertenecieron a la clase Dothideomycetes y entre ellos el 55% al orden Pleosporales. La mayoría de los DSE identificados hasta el momento pertenecen al orden Helotiales, aunque también se han reportado hongos DSE pertenecientes Capnodiales, Chaetosphaeriales, Chaetothyriales, Helotiales, Leotiales, Pezizales, Pleosporales y Sordariales (Mandyam y col. 2010; Newsham 2011).

De los 47 hongos dematiáceos obtenidos se consiguieron obtener 35 secuencias de la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2, que fueron utilizadas para realizar análisis filogenéticos con el fin de identificar los aislamientos y complementar los caracteres morfológicos. El éxito de cada identificación fue variable y dependió de cada género.

El género *Alternaria*, actualmente forma parte de un complejo que lleva el mismo nombre y que fue dividido en ocho secciones (Woudenberg y col. 2013). La sección *Alternata*, es la presentó mayor número de representantes en este trabajo. En diversos análisis filogenéticos, los nodos dentro de esta sección mostraron en general, bajo sustento (Woudenberg y col. 2013). El único estudio filogenético que mostró mayor soporte (<79%), se basó en un conjunto de datos combinados pertenecientes a 5 genes: GAPDH, Factor de elongación 1-Alfa, actina, la ATPasa de membrana plasmática y calmodulina (Lawrence y col. 2013). Afortunadamente, la mayoría de los aislamientos pertenecientes al género *Alternaria* aislados en este trabajo, produjeron estructuras reproductivas, por lo que, si bien la

secuencias de los ITS no son del todo adecuadas para realizar su identificación molecular, fue posible complementar esta información con caracteres morfológicos.

El género *Phoma* recientemente ha sido dividido en nueve secciones en base a caracteres morfológicos y análisis moleculares que permitieron asociar a este anamorfo con cuatro géneros teleomorfos, lo que ha llevado a concluir que este género tiene un origen polifilético (de Gruyter y col. 2013). En este trabajo fueron identificados aislamientos pertenecientes a las secciones: *Paraphoma*, *Peyronellae* y *Boeremia*. A partir de los análisis filogenéticos se logró identificar a estos aislamientos como *Paraphoma radicina*, *Peyronellae* sp y *Boeremia* sp. *Paraphoma radicina* formó un clado monofilético y se separó de otras especies de la sección *Paraphoma*, en cambio tanto *Peyronellae* como *Boeremia* presentaron alta similitud dentro de cada sección, impidiendo la identificación a nivel de especie. Estos resultados coinciden con los obtenidos por de Gruyter y col. (2013), quienes han recomendado el empleo de las secuencias de los ITS para este grupo, pero debido a la alta similitud dentro de las secciones, consideran necesario hacer observaciones morfológicas.

En el caso de *Macrophomina phaseolina*, *Corynespora cassicola* y *Curvularia trifolii*, al alinear sus secuencias en el MycoBank, los resultados fueron certeros, ya que el programa arrojó alta similitud y cobertura ($\geq 99\%$). Además las identificaciones fueron confirmadas a través de caracteres morfológicos. En cambio el aislamiento identificado por caracteres moleculares como *Phaeosphaeria* sp., debido a la imposibilidad de observar estructuras reproductivas en el cultivo *in vitro*, no fue posible su identificación a nivel de especie.

La utilidad de los genes utilizados en este trabajo para realizar las identificaciones fue relativa y dependió del grupo analizado, en algunos de los casos, la región de ADNr (ITS) utilizada no alcanzó para discriminar las distintas especies. Debido a la alta heterogeneidad taxonómica de los hongos DSE, era de esperar que las secuencias pudieran ser de mayor utilidad en algunos casos y ser poco informativas en otras. De los pocos trabajos que han identificado y estudiado la diversidad de estos hongos en ambientes naturales o que se han limitado solamente a realizar estudios de filogenia, muchos han empleado las secuencias ITS (Grünig y col. 2009; Walker y col. 2011; Zijlstra y col. 2005). De hecho hay muchos grupos que pueden ser identificados con ellas. Sin embargo, en esta tesis se han encontrado géneros

no descritos en los mencionados trabajos como hongos DSE y asimismo, muchos de los géneros identificados en esos trabajos no han sido encontrados en éste. Entonces además de considerar el empleo de otros genes o secuencias de genes, es fundamental tener en cuenta los caracteres morfológicos junto con los moleculares con el fin de arribar a conclusiones consistentes. Cabe destacar además, que a la hora de hacer los análisis filogenéticos es necesario realizarlo con secuencias confiables, ya que hasta el momento las bases de datos son libres y en algunos casos, errores en las identificaciones morfológicas estarían introduciendo identificaciones moleculares equivocadas.

La mayoría de los trabajos relacionados con los hongos DSE realizados en Argentina, se han enfocado en la observación y cuantificación de la abundancia en función de la tinción de las raíces de distintos hospedantes naturales e incluyendo en sus análisis a los hongos MA. Así, los hongos DSE se han encontrado en más de 48 familias de plantas de diversos hábitats, hallándose en distintas regiones de la provincia de Córdoba (Fracchia y col. 2009; Menoyo y col. 2007; Urcelay 2002), llanuras y montañas de Tucumán (Albornoz y col. 2014; Lizarraga y col. 2015), sitios salinos de las provincias de Salta, Jujuy y Córdoba (Cofré y col. 2012) y climas fríos, como distintas regiones de la Patagonia (Fernández y col. 2010; Fernández y col. 2008; Salgado Salomón y col. 2013). Dos trabajos tuvieron en cuenta, además de la abundancia de los hongos DSE y MA, parámetros nutricionales de las plantas (García y col. 2012) y del suelo (Grilli y col. 2013). Estos trabajos, al igual que los del resto del mundo, coinciden en que este grupo de hongos endófitos se encuentra ampliamente distribuido. Sin embargo, se hace necesario profundizar su conocimiento para comprender el rol que cumplen en los ecosistemas. De esta manera, se hace imprescindible el aislamiento, identificación y caracterización en condiciones artificiales. Muy pocos trabajos se dedicaron al aislamiento e identificación de cepas autóctonas (Cisneros y col. 2010; Fracchia y col. 2014; Navarro 2008; Rothen y col. 2010). En este sentido, cabe mencionar que este trabajo es pionero en el estudio de las comunidades de DSE en nuestro país.

A nivel mundial, si bien existen trabajos en los que se aislaron e identificaron hongos DSE, no se han realizado estudios de los endófitos presentes en las raíces de *G. max*, aún cuando es uno de los cultivos de mayor importancia. Por ello, hasta el momento no existen

reportes de la estructura de las comunidades de hongos DSE en las raíces de este hospedante. Hamayun y col (2009), aislaron endofitos septados oscuros de raíces de esta planta, pero solamente identificaron un aislamiento, *Cladosporium sphaerospermum*, el que fue caracterizado y mostró capacidad para promover el crecimiento de plántulas de su hospedante natural.

Entre los trabajos que aislaron e identificaron hongos DSE, pueden mencionarse los realizados por Mandyam y col. (2010) en una pradera de pastos nativos, sometida a frecuentes incendios en Kansas, por Naik y col. (2009) a partir de cultivos de *Oryza sativa* en el sur de India y de Xu y col. (2015) a partir de *Nepal aliso* en zonas mineras del suroeste de China. En cambio, en *G. max* la mayoría de los trabajos se han concentrado en el aislamiento de hongos endófitos a partir de vástago: en la región de Minnesota, EE.UU. (Impullitti y Malvick 2013), de La Plata-Argentina (Larran y col. 2002) y del departamento de Paraná, Brasil (Pimentel y col. 2006). Entre los géneros encontrados en esta tesis, sorprendentemente el género *Cladosporium*, fue aislado de todos los trabajos científicos mencionados, *Curvularia* de los pastos nativos de Kansas y de vástago de *G. max*, y *Alternaria* fue encontrado en todos los trabajos en los que aislaron a partir de la parte aérea. En el caso de *Chaetomium* fue encontrado tanto en raíces de *Oryza sativa* como en vástagos de *G. max*, mientras que *Humicola* y *Coniothyrium* fueron aislados únicamente de raíces de *Oryza sativa*. En correspondencia con estos trabajos, la mayoría de las especies aisladas e identificadas en este trabajo, ya fueron encontradas creciendo en forma endofítica. Cabe destacar, por otra parte, que en el trabajo realizado por Naik y col. (2006) en la India, aislaron endofitos a partir de raíces y vástagos de *Oryza sativa* y encontraron aislamientos de *Chaetomium globosum* y *Penicillium chrysogenum*, que presentaron propiedades antagonistas frente a patógenos de ese hospedante, dejando abierta la posibilidad de que muchos de los aislamientos encontrados puedan presentar capacidades semejantes.

La mayoría de los géneros encontrados en este trabajo, también han sido aislados de suelo rizosféricos, este es el caso de *Alternaria*, *Humicola*, *Curvularia*, *Phoma*, *Chaetomium* y *Cladosporium* (Fernández di Pardo, 2014; Rodríguez y col. 2015). De hecho al aislar hongos a partir de la rizósfera, es posible obtener micelio endofítico extrarradical, además de

que estos hongos pueden presentar distintos niveles de saprofitismo. Este hecho ha llevado a postular que los hongos DSE, podrían ser saprobios oportunistas, por ejemplo *Phialocephala fortinii* pasa a ser levemente patógeno o saprobio oportunista al cambiar las condiciones de cultivo, pudiendo entonces ejercer un efecto perjudicial en la planta (Jumpponen & Trappe, 1998).

Dos de los aislamientos identificados son patógenos de soja bien conocidos y económicamente importantes: *Macrophomina phaseolina* y *Corynespora cassicola*. *M. phaseolina* es el agente causal de la podredumbre carbonosa afectando las raíces (Gutiérrez y col. 2002) y *C. cassicola* produce la mancha anillada, afecta principalmente a la hoja, pero también puede verse en pecíolo, tallo y raíz (Cabrera y col. 2006). *Alternaria alternata* y *Cladosporium* sp fueron citados como patógenos menores solamente en ciertos casos (Sinclair, 1991). Los hongos aislados en este trabajo, podrían constituir cepas avirulentas, o virulentas en una fase latente, ya que fueron aisladas a partir de plantas en buen estado. El tipo de interacción que establecen estos hongos con la planta se describe en el próximo capítulo.

Las comunidades de hongos DSE en estudio mostraron diferencias. La riqueza y la diversidad fueron menores en las comunidades de la etapa de crecimiento R3, independientemente del suelo del que provenían. Esta diferencia está dada porque, en esta etapa, ambas comunidades (BA R3 y CA R3) presentaron valores menores en los índices de Gleason, Shannon-Weiner y Simpson, debido al menor número de especies que además se distribuyeron desigualmente, con una predominancia de *Alternaria alternata* y *Paraphoma radicina*. Estos resultados podrían estar indicando que, a medida que avanzan los estadios de desarrollo, existiría una sucesión de especies en las raíces de *G. max*, pero se requieren estudios adicionales.

CAPÍTULO II

**SELECCIÓN DE HONGOS ENDOFITOS SEPTADOS: EVALUACIÓN DE
LOS EFECTOS EN SU HOSPEDANTE Y SU POTENCIAL EN LA
PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL**

INTRODUCCIÓN

Las relaciones entre los hongos colonizadores de las raíces han sido catalogadas dentro de un amplio rango de tipos de asociaciones que abarcan desde el mutualismo al parasitismo (Johnson y col. 1997; Jumpponen 2001; Smith y Read 1997). Las mutualistas resultan ser beneficiosas para ambos miembros de la asociación, mientras que las relaciones parasíticas son definidas por la ganancia de una de las partes, que resulta en una pérdida para el otro participante de la asociación (Addicott, 1984). Desde el punto de vista nutricional, en su relación con el hospedante, los hongos parásitos pueden ser biótrosos, si obtienen sus nutrientes directamente a partir de células vivas, o necrótrofos, si primero destruyen la célula parasitada para luego absorber sus nutrientes. Existe una categoría intermedia de parásito que comparte similitudes con los dos tipos mencionados, los hemibiótrosos. Éstos mantienen a las células vivas en las etapas iniciales de la infección, pero las matan en etapas posteriores (Agrios 1995; O'Connell y col. 2012). Desde un punto de vista anatómico, en las asociaciones de tipo no mutualísticas se ha observado la formación de apocisiones y otras modificaciones de pared, por ejemplo las papilas, procesos que se asocian típicamente con la penetración de las hifas de hongos patógenos necrótrofos o hemibiótrosos, pero no de hongos patógenos biótrosos (Hardham y Mitchell 1998; Harrison 1999).

Aunque las asociaciones de tipo micorrícicas han sido las más estudiadas hasta el momento, está bien documentado que las raíces de las plantas se encuentran colonizadas por numerosos hongos, de los que aún no se ha determinado su función (Newsham y col. 1995). La mayoría de las investigaciones sobre DSE y hongos afines, se han enfocado en el estudio de su distribución y posibles funciones ecológicas (Addy y col. 2005; Mandyam y Jumpponen 2005, 2008) o en la descripción de la diversidad genética y las relaciones filogenéticas dentro del grupo, principalmente del complejo *Phialocephala fortinii*-*Acephala applanata* (Grünig et al. 2007; Piercey y col. 2004).

Actualmente existe un debate acerca del papel que los DSE desempeñan en el ecosistema y en particular, en su hospedante. Varios trabajos destacan aspectos positivos, entre ellos, la protección frente a patógenos del suelo (Narisawa y col. 2002; Narisawa y col. 2004), la síntesis de fitohormonas o la mineralización de compuestos orgánicos presentes en la rizósfera (Newsham 2011; Upson y col. 2010; Usuki y Narisawa 2007).

Otros trabajos, sin embargo, indican que estos endofitos pueden ser, en ciertas condiciones, patogénicos (Mandyam y col. 2013; Wilcox y Wang 1987) o actuar como comensalistas (Violi y col. 2007). Se sabe que las interacciones entre organismos estrechamente asociados pueden desencadenar distintos efectos en cada uno de ellos dependiendo de las condiciones ambientales (Bronstein, 1994). Esto significa que una relación beneficiosa puede convertirse en parasítica si los recursos de los que depende la asociación pasan a ser limitados o a estar disponibles en exceso (Graham y Eissenstat 1994; Johnson 1993; Jones y Smith 2004). Con el fin de esclarecer las funciones ecológicas que juegan los DSE, en general y sus géneros componentes, en particular, es esencial tanto su adecuada identificación como una cuidadosa caracterización al utilizarlos en los experimentos (Wilcox y Wang 1987).

El conocimiento acerca del papel de los hongos DSE en la utilización de nutrientes es limitado. Se cree que son particularmente importantes en los casos en que estos se encuentran formando parte de sustancias orgánicas complejas o compuestos recalcitrantes que de otra forma no estarían disponibles para la planta hospedante (Barrow y Aaltonen 2001). Este fenómeno es consecuencia de la variedad de enzimas extracelulares que han demostrado producir estos organismos. Así en ciertas cepas de *Phialophora finlandia* y *Phialocephala fortinii* se ha documentado la presencia de distintas actividades enzimáticas que incluyen amilasas, celulasas, laminarinasas, pectinasas, proteasas y xilanasas (Caldwell y col. 2000). Dichas capacidades sugieren que los hongos DSE tendrían alto potencial para acceder al carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) de detritos presentes en el suelo y facilitarían de este modo la adquisición de los nutrientes (Mandyam y col. 2010). Poco se conoce de las implicancias de estas propiedades en la simbiosis; es decir, cuál es el grado de saprofitismo y biotrofismo que poseen estos hongos y si esta dualidad varía en función de las condiciones ambientales, las interacciones con el hospedante o de la especie de hongo DSE en cuestión.

En relación con la capacidad para promover el crecimiento vegetal por parte de los hongos DSE, se conoce muy poco. Sin embargo, este tipo de respuesta ha sido muy estudiada en otros grupos de microorganismos. En general, entre los mecanismos involucrados se han mencionado la producción de fitohormonas, como el ácido indolacético (AIA), el ácido giberélico (GA3), el ácido abscísico (ABA) y las citoquininas. También ha sido atribuida a efectos directos ocasionados por la mayor

disponibilidad de nutrientes debido a la degradación de detritos, como se ha mencionado y a la solubilización de fosfatos. Otros mecanismos, menos directos, son la modificación del ambiente rizosférico a través de la producción de distintos metabolitos como sideróforos, antibióticos y antifúngicos, entre otros (Bhattacharyya y Jha 2012; Lugtenberg y Kamilova 2009; Siddiqui 2006).

En particular en el caso de los hongos DSE, hay pocas evidencias que expliquen los efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas, Barrow y Osuna (2002) informaron que una cepa de *Aspergillus ustus*, considerada como un hongo DSE y que mostró una asociación de tipo mutualística con *Atriplex canescens*, logró hidrolizar fuentes de fósforo (P) no disponible para la planta como fosfato de tricalcio, incrementando la biomasa de vástago y raíz. Como consecuencia de ello, sugirieron que este hongo mejoraba a través de esta capacidad, la nutrición de la planta hospedante. Por otra parte, fue demostrado que un hongo DSE aislado de *Hymenoscyphus ericae* produjo ácido indol-3-acético (AIA), hormona vegetal con diversos efectos en el metabolismo vegetal, tal como la elongación de las células (Gay y Debaud 1986). Bartholdy y col. (2001) detectaron la producción de sideróforos en varios aislamientos de *Phialocephala fortinii*, y dicha producción se vió afectada por el pH del medio y la concentración de Hierro. (Hamayun y col. 2009) encontraron que un DSE aislado de *G. max* promociona el crecimiento de plántulas cuando riegan el meristema apical con exudados del hongo y detectan la presencia de giberelinas.

Por otra parte, en relación con estudios de la interacción a nivel anatómico, las características estructurales de las paredes de los hongos DSE han generado algunas controversias. Es sabido que la pared de la célula fúngica está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Los principales polisacáridos componentes son la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano y a ellos se encuentran asociadas las proteínas formando glicoproteínas. Todos estos componentes combinados dan origen a la rigidez característica de la pared de los hongos (Rogerson y Webster, 1981). Muchas veces, como ocurre en el caso de los hongos DSE, las paredes pueden presentar deposiciones de melanina. Ésta es considerada un grupo de sustancias, o pigmentos, de alto peso molecular y naturaleza heterogénea, que se caracterizan por su estabilidad y resistencia (Butler y col. 2005; Gomez y Nosanchuk 2003).

Barrow y Aaltonen (2001) observaron diferencias en la respuesta de estos hongos a tinciones tradicionales con Tripán Blue. Advirtieron que, porciones del micelio que eran hialinas podían permanecer hialinas aún después de la tinción, o a veces, teñirse sin mayores inconvenientes, y porciones con una notable melanización resultaron ser, en general, más difíciles de teñir. El colorante Tripán Blue, tiñe la pared celular de los hongos por tener afinidad con la quitina (Phillips y Hayman 1970). Por esta razón, se ha atribuido las diferencias en la tinción al contenido diferencial de quitina y melanina en la pared de las estructuras fúngicas (Barrow y Aaltonen 2001). Así las hifas hialinas, que según se ha sugerido, estarían involucradas en el proceso de infección (Jumpponen y Trappe 1998; Newsham 1999; Yu et al. 2001), presentarían un escaso contenido de quitina en la pared o bien una escasa formación de pared celular durante dicho proceso (Barrow y Aaltonen, 2001; Haselwandter y Read 1980). Además Yu y col. (2001) observaron que *Phialocephala fortinii* colonizó la raíz de *Asparagus officinalis* con hifas hialinas que formaron un continuo con hifas melanizadas producidas también por ese hongo, motivo por el que es probable que muchas veces se haya subestimado la colonización de estos hongos en ambientes naturales.

Por otra parte se ha postulado que, las hifas internas hialinas que no logran teñirse con Tripán Blue, presumiblemente estarían protegidas por el ambiente interno de la raíz y por ello, carecen de quitina y de melanina (Barrow y Aaltonen 2001). Su menor diámetro y su prevalencia en raíces fisiológicamente activas en contraste con la abundancia de hifas melanizadas en tejidos menos activos ha sugerido que serían más permeables y con un mayor potencial para el intercambio de recursos con el hospedante (Yu y col. 2001). Podrían considerarse, por ende, como las fases activas de los hongos DSE en oposición a los microsclerocios, que son más frecuentes en plantas fisiológicamente inactivas. Estos últimos, constituyen propágulos vegetativos con paredes gruesas y melanizadas que los protegen en condiciones desfavorables (Peterson y col. 2008).

Conocer el tipo de interacción que establecen los hongos DSE con su hospedante y caracterizarlos en cuanto a sus capacidades para producir reguladores del crecimiento, enzimas hidrolíticas y solubilizar fosfatos, son aspectos que pueden contribuir a establecer las posibles funciones de estos endofitos.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Los hongos endofitos septados oscuros que colonizan las raíces de *G. max* pueden presentar un amplio rango de respuestas sobre la planta hospedante que se evidencian a través de análisis de la interacción tanto macroscópica, como microscópicamente.
- Los hongos DSE presentan diferentes capacidades para producir enzimas, hormonas de crecimiento y solubilizar fósforo.
- La respuesta desencadenada por los hongos DSE en *G. max*, depende tanto de las capacidades mencionadas como de identidad del hongo DSE.

OBJETIVOS PARCIALES

- Verificar el carácter endofítico de los hongos aislados a través de la resíntesis en su hospedante natural.
- Describir el tipo de interacción establecida entre cada aislamiento endofítico y su hospedante, mediante observaciones macroscópicas del estado general de la planta y microscópicas de la raíz. Relacionar la presencia o no de síntomas de enfermedad con el tipo de interacción a nivel anatómico, observado en raíz.
- Caracterizar los aislamientos en cuanto a la capacidad de solubilizar fósforo, producir enzimas hidrolíticas y ácido indolacético (AIA).
- Establecer si la identidad del hongo DSE y/o sus capacidades se relacionan con el tipo de interacción establecida con *G. max*.
- Seleccionar aislamientos potencialmente promotores del crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

RESÍNTESIS IN VITRO CON *GLYCINE MAX*

Con el fin de realizar una primera selección y confirmar el carácter endofítico de los aislamientos de hongos dematiáceos, se realizaron ensayos de re-infección en el hospedante. Para ello se esterilizaron superficialmente semillas de *G. max* en una solución de NaOCl 10% por 15 min, eliminando ésta a través de tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri con Agar Agua, incubadas a 25°C en oscuridad hasta que se produjo la emergencia de la radícula, momento en el que fueron transferidas a cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a 25°C y 60% de humedad. Una vez que sus cotiledones se encontraban completamente verdes, se procedió a su inoculación.

INOCULACIÓN DE LAS PLÁNTULAS

El proceso de inoculación se llevó a cabo colocando una plántula de *G. max* sobre una colonia de 7 días, crecida en una caja de Petri de 5 cm de diámetro con AEM, de cada uno de los aislamientos, que fueron evaluados por triplicado. Las plántulas se dispusieron de modo tal que existiera un íntimo contacto entre la raíz y el hongo y se colocaron por 48 hr en cámara de cultivo con 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a 25°C y 60% de humedad. Se utilizaron como tratamiento control, cajas de Petri de 5 cm con AEM en las que se colocaron las plántulas, sin inoculación del hongo.

Este modo de inoculación además permitió realizar la primera clasificación en cuanto al comportamiento de los aislamientos, ya que fueron detectados aquellos que produjeron la muerte de la plántula, es decir los hongos necrótrofos.

CULTIVO IN VITRO DE *G. MAX*

Las plántulas inoculadas se transfirieron a Erlenmeyers de 250 ml de capacidad, con 100 ml de medio Murashige y Skoog (MS-SIGMA), pH 5,5. Los erlenmeyers se sellaron con film y se incubaron por 30 días, en cámara de cultivo, con ciclos de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a 25 °C y 60% de humedad. En el momento de la cosecha, se registró el estado general de la planta y las raíces fueron sometidas al proceso de tinción. Éste consistió en sumergirlas en KOH 10% por 5 min a 90°C, neutralizar el pH

con una solución de HCl 2% durante 5 min, lavar con agua corriente tres veces y teñir con Tripán Blue 0.1% en ácido láctico por 10 min a 90°C (Phillips y Hayman 1970). Luego de retirar el excedente de colorante, las raíces teñidas fueron conservadas en ácido láctico. Se realizaron observaciones al microscopio óptico y se registró la presencia y el modo de colonización de cada aislamiento en los tejidos de la raíz de *G. max*.

Cuando se registró el estado general de la planta, en aquellos casos en los que se observaron distintas alteraciones en comparación con las plantas control, ya sea en vástago o en raíz, éstas se consideraron como distintos grados de enfermedad. (Coto, 1999) El tipo de sintomatología observada se describió y clasificó como se indica en la tabla II-1.

Tabla II-1. Descripción de los síntomas de enfermedad encontrados en el vástago de *Glycine max*.

| | |
|---------------------------|---|
| Pudrición blanda | Desintegración de tejidos con liberación de líquidos celulares. |
| Halos cloróticos | Bandas de color verde claro ubicadas alrededor de áreas necrosadas. |
| Marchitez | Deshidratación de los tejidos. Manifestación externa de deficiencia en el suministro de agua. |
| Manchas necróticas | Muerte de los tejidos sectorizada, la mas común es la mancha foliar. |

PRODUCCIÓN DE AIA

Para la detección y cuantificación de ácido indol 3-acético (AIA) los aislamientos se cultivaron en 10 ml de medio que contenía en 1lt: glucosa, 2.5 g; succinato de sodio 2.5 g; K₂HPO₄ 6 g; KH₂PO₄ 4 g; KOH 2,1 g; NH₄Cl 1 g; MgSO₄·7H₂O 0.2 g; NaCl 0.1 g; CaCl₂·2H₂O 0.02 g; FeCl₃ 0.01 g; y Na₂MoO₄·2H₂O 0.002 g (Fuentes-Ramirez y col. 1993), contenido en cajas de petri de 5 cm de diámetro. Se incorporó L-triptofano (Khalid y col. 2010) para promover la producción de este regulador del crecimiento y, se dejó crecer por 7 días en oscuridad a 25°C. Para revelar la presencia de AIA se tomó una alícuota de 2 ml del cultivo y se centrifugó a 12000 g. Al sobrenadante obtenido se le agregó el mismo volumen del reactivo de Salkowski (Gordon y Weber 1950). En presencia de AIA este desarrolla color rojo y dependiendo de su concentración varía la intensidad, la que fue cuantificada en espectrofotómetro a 530 nm. Los valores

obtenidos se compararon con una curva patrón realizada con una solución estándar de AIA (Merck)

SOLUBILIZACIÓN DE P

Con el fin de evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico, los hongos aislados fueron incubados en placas de Petri con medio NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate's growth), que contiene fosfato tribásico de Calcio (PC) durante 10 días a 25°C. Aquellos aislamientos capaces de solubilizar fósforo muestran en este medio, un halo traslúcido. Se registró para cada aislamiento la presencia/ausencia de dicho halo (Nautiyal, 1999).

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Se realizaron cuantificaciones de actividades enzimáticas con dos propósitos, por un lado ver si existe una relación entre las capacidades enzimáticas y el comportamiento al colonizar el hospedante, y por otro lado, para determinar el potencial de las cepas en la descomposición de materia orgánica y aumentar la disponibilidad y/o adquisición de diferentes fuentes de C, N y otros elementos para la planta hospedante.

Se determinó la actividad de enzimas hidrolíticas que liberan azúcares reductores. Entre estas, dos enzimas celulolíticas, endoglucanasas y exoglucanasas, y una enzima pectinolítica, la polimetilgalacturonasa. En la Figura II-14 se puede observar una síntesis de los pasos realizados para la cuantificación de las dichas actividades.

INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Para inducir la síntesis de estas enzimas, se cultivaron todos los aislamientos en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con 10 ml de medio basal (MB) más el sustrato específico para cada enzima. Para la Endoglucanasa, MB con 1% de carboximetilcelulosa (CMC, Sigma), para la Exoglucanasa, MB con 1% de celulosa cristalina (Sigma) y para la Polimetilgalacturonasa, MB más 1% de pectina de manzana (Sigma). Los cultivos se mantuvieron en agitación (100 rpm) por dos semanas a 25°C y para obtener la fuente de enzima, se extrajo una alícuota de 2 ml. Finalmente se centrifugó para eliminar los restos de micelio y se conservó el sobrenadante.

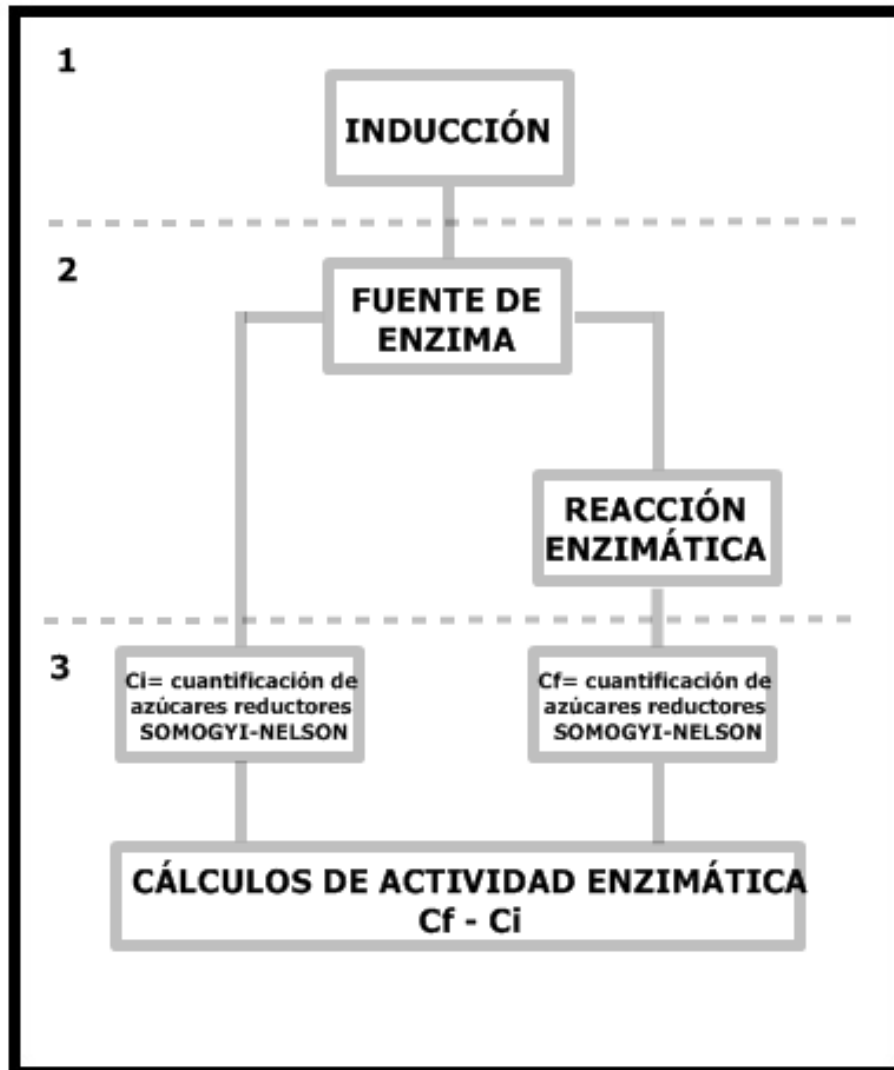


Figura II-1. Esquema de las etapas realizadas para la cuantificación de las actividades enzimáticas.

REACCIONES ENZIMÁTICAS

Para calcular la actividad enzimática se realizó una reacción y luego se midió la cantidad de azúcares reductores, pero fue necesario conocer la cantidad de azúcar inicialmente presente en el sobrenadante. Por dicho motivo 0.25 ml de la fuente de enzima fueron utilizados para realizar la reacción enzimática (concentración final, Cf), y 0.25 ml para medir la concentración de azúcares reductores (concentración inicial, Ci).

ENDOGLUCANASA

Se utilizó como sustrato Carboximetilcelulosa (CMC) 0.5% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.8, que se colocó junto con 0.25 ml de la fuente de enzima (sobrenadante) en un volumen total de 0.5 ml. Para el blanco de sustrato se colocó agua

en lugar de la fuente de la enzima, luego se incubó en baño térmico a 50°C por 30 minutos (Wood y Bhat 1988). La reacción se detuvo con el agregado del reactivo de Somogyi y se continuó con la reacción de Somogyi-Nelson.

EXOGLUCANASA

Se utilizó como sustrato celulosa cristalina 1% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.8. El sustrato se mantuvo en agitación permanente mientras se agregó a los tubos de reacción y se colocó junto con 0.25 ml de la fuente de enzima en un volumen total de 0.5 ml (Wood & Bhat, 1988). Para el blanco de sustrato se colocó agua en lugar de la fuente de la enzima. Se incubó en baño térmico a 50°C por 30 minutos (Wood & Bhat, 1988). La reacción se detuvo con el agregado del reactivo de Somogyi.

POLIMETILGALACTURONASA

Para realizar la reacción se usó una suspensión de pectina de manzana 0.1% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5.5. En cada uno de los tubos de reacción se agregó el sustrato y la fuente de enzima (sobrenadante) en un volumen total de 0.5 ml. El blanco de sustrato se realizó agregando agua en lugar de la fuente de enzima. Se incubó en baño a 50° C por 30 minutos (Ramos y col. 2010), la reacción se detuvo con el agregado del reactivo Somogyi.

CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE SOMOGYI-NELSON

La cuantificación de los azúcares reductores se llevó a cabo de la misma forma para todas las muestras. Se realizó el blanco de reactivo, agregando agua en lugar de la muestra. Para calcular la cantidad de azúcar se realizaron curvas patrón con glucosa (monómero de celulosa y CMC) y ácido galacturónico (monómero de pectina). La reacción de Somogyi-Nelson se encuentra detallada en el Anexo. A diferencia del protocolo original de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1951) en el que se mide la absorbancia a 540 nm, ésta se midió a 630 nm (Marias, Wit, & Quicke, 1966). Se realizó el cálculo de la actividad enzimática (ver Anexo), la que fue expresada en Unidades Internacionales (UI) como μmol de producto / min. ml.

La composición de los medios utilizados se encuentra detallada en el Anexo.

RESULTADOS

RE-SÍNTESIS DE LOS AISLAMIENTOS EN PLANTAS DE *GLYCINE MAX*

A partir de los resultados obtenidos fue posible clasificar las interacciones resultantes en cuatro grandes grupos. Los criterios de clasificación se encuentran expuestos en la Tabla II-2.

Tabla II-1. Criterios de clasificación utilizados para categorizar las interacciones observadas al realizar la resíntesis de los aislamientos en *G. max*.

| CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN | | |
|---|---|---|
| Categorías | Aspecto general de la planta | Observación al microscopio de la raíz |
| 1. Endofitos en sentido estricto | -Planta sin síntomas | -Infección asintomática. -Colonización extendida a lo largo de la raíz y principalmente paralela al eje mayor de ésta. |
| 2. Endofitos en sentido amplio | -Planta sin síntomas. | -Presencia de papilas. -Tejido radicular desorganizado. -Colonización localizada y perpendicular al eje mayor de la raíz. |
| 3. Patógenos biótropos | -Hojas cloróticas -Manchas foliares -Presencia de micelio blanquecino | -Colonización desorganizada -Tejido radicular desorganizado |
| 4. Patógenos necrótrofos | -Pudrición | -Tejidos vegetales en descomposición |

Esta clasificación se basó en observaciones macro y microscópicas. A nivel macroscópico, según el aspecto de la planta, los aislamientos se clasificaron en dos grandes grupos: aislamientos asintomáticos y aislamientos sintomáticos. Dentro de los asintomáticos se realizó una nueva división, basada en la observación microscópica de las raíces. En función de estas observaciones se distinguieron dos grupos: endofitos que colonizaron la raíz sin alterar las células del tejido hospedante (Categoría 1) y los que produjeron alteraciones en las células vegetales (inducción de papilas, desorganización celular) (Categoría 2). Los aislamientos con comportamiento sintomático fueron

clasificados en función del tipo de efecto observado en la planta hospedante, distinguiéndose también dos grupos: patógenos hemibiótrofos (Categoría 3) y patógenos necrótrofos (Categoría 4).

A continuación, en la tabla II-3, se encuentra listados los aislamientos, la categoría en la que fueron ubicados y en caso de existir, el síntoma causado.

Tabla II-3. Clasificación de los aislamientos según los síntomas ocasionados en la planta. Cuando no se observaron síntomas, la planta mostró buen estado general.

| Género/especie | Código del aislamiento | Categoría | Síntomas |
|------------------------------|------------------------|-----------|-------------------------------|
| <i>Paraphoma radicina</i> | CA XIV 4-2 | 2 | - |
| | CA 2 3-2 | 1 | - |
| | BA XVI 2-5 | 3 | Pudrición blanda |
| | BA 3 2-1 | 2 | - |
| | BA 5 2-1 | 3 | Marchitamiento |
| | BA 13 1-1 | 2 | - |
| | BA 13 5-4 | 2 | - |
| | BA 19 3-1 | 3 | Marchitamiento |
| <i>Phaeosphaeria sp.</i> | BA IX 1-3 | 2 | - |
| | BA XIII 1-1 | 1 | - |
| <i>Alternaria alternata</i> | CA 10 5-3 | 3 | Ápice con micelio blanquecino |
| | CA 18 5-5 | 3 | Clorosis sistémica |
| | BA IX 2-1 | 3 | Marchitamiento |
| | BA 7 1-1 | 4 | Pudrición blanda |
| | BA 7 4-2 | 1 | - |
| | BA 11 2-1 | 4 | Caída temprana de hojas |
| | BA 18 4-2 | 3 | Ápice con micelio blanquecino |
| | BA 21 1-1 | 3 | Marchitamiento |
| | BA 21 5-3 | 1 | - |
| | BA 23 2-2 | 3 | Ápice con micelio blanquecino |
| <i>Alternaria arborecens</i> | CA XIII 4-1 | 3 | Clorosis sistémica |
| | BA XVIII 5-3 | 1 | - |
| | BA 21 4-4 | 3 | Hojas cloróticas |
| <i>Alternaria sp 1</i> | CA 16 4-1 | 2 | - |
| <i>Alternaria sp 2</i> | CA 18 5-4 | 3 | Ápice con micelio blanquecino |
| <i>Alternaria sp 3</i> | BA VI 1-1 | 1 | - |
| <i>Curvularia trifolii</i> | BA 4 3-4 | 4 | Pudrición blanda |
| <i>Boeremia sp.</i> | CA XII 1-1 | 3 | Marchitamiento |
| | CA XVIII 3-1 | 3 | Hojas cloróticas |
| <i>Peyronellae sp.</i> | CA XVIII 4-2 | 2 | - |
| | BA I 1-4 | 4 | Marchitamiento |
| | BA VII 5-1 | 3 | Hojas cloróticas |
| <i>Corynespora cassicola</i> | CA III 1-3 | 3 | Clorosis sistémica |

| | | | |
|------------------------------------|-------------|---|--------------------|
| | CA III 3-2 | 3 | Clorosis sistémica |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | CA 16 5-4 | 1 | - |
| <i>Macrophomina phaseolina</i> | BA 8 2-2 | 4 | Pudrición blanda |
| <i>Monodyctis sp.</i> | BA 4 3-5 | 2 | - |
| <i>Humicola grisea</i> | CA XXI 3-1 | 4 | Pudrición blanda |
| <i>Humicola fuscoatra</i> | CA IV 1-1 | 1 | - |
| <i>Chaetomium sp.</i> | BA VII 1-2 | 3 | Marchitamiento |
| <i>Morfotipo 1</i> | CA I 1-3 | 1 | - |
| <i>Morfotipo 2</i> | CA IX 1-4 | 2 | - |
| <i>Morfotipo 3</i> | CA XVI 1-5 | 4 | Pudrición blanda |
| <i>Morfotipo 4</i> | CA 18 3-2 | 2 | - |
| <i>Morfotipo 5</i> | CA 20 4-4 | 4 | Marchitamiento |
| <i>Morfotipo 6</i> | BA XIII 1-2 | 3 | Hojas cloróticas |
| <i>Morfotipo 7</i> | BA 9 2-2 | 1 | - |

COLONIZACIÓN DE LAS RAÍCES DE *G. MAX*

A partir de los resultados anteriores, fueron observadas al microscopio óptico las raíces de los hongos incluidos en las categorías 1, 2 y 3. A continuación se describen los patrones de colonización, agrupados según su identificación taxonómica.

PARAPHOMA RADICINA

Paraphoma radicina ocupó los espacios intercelulares con hifas hialinas, las que resultaron muy difíciles de observar por la falta de coloración con Tripán Blue. Algunas zonas de la raíz fueron intensamente colonizadas sin alterar la morfología de las células corticales. En superficie se encontraron tanto hifas asociadas al rizoplaneo, incluso ingresando a la raíz en la zona de contacto entre dos células, como hifas formando apresorios.

El 50% de los aislamientos de *P. radicina* (CA XIV 4-2, BA 3 2-1, BA 13 1-1 y BA 13 5-4) indujeron la producción de abundante cantidad de papilas (Figura II-2(B-C)), engrosamientos de la pared celular de la planta, en las células corticales y en la superficie se observó gran cantidad de apresorios (Figura II-2A). Este aspecto facilitó la observación de las hifas que, como se mencionó, en general fue difícil de distinguir. Estos aislamientos de *P. radicina* fueron incluidos en la categoría 2, porque si bien perjudicaron el aspecto de la planta, presentaron signos de resistencia.

De los aislamientos de *Paraphoma radicina* restantes, tres (BA XVI 2-5, BA 5 2-1 y BA 19 3-1) presentaron escasa cantidad de papilas. Estos fueron incluidos en el Categoría 3, por inducir la presencia de síntomas de enfermedad en la planta.

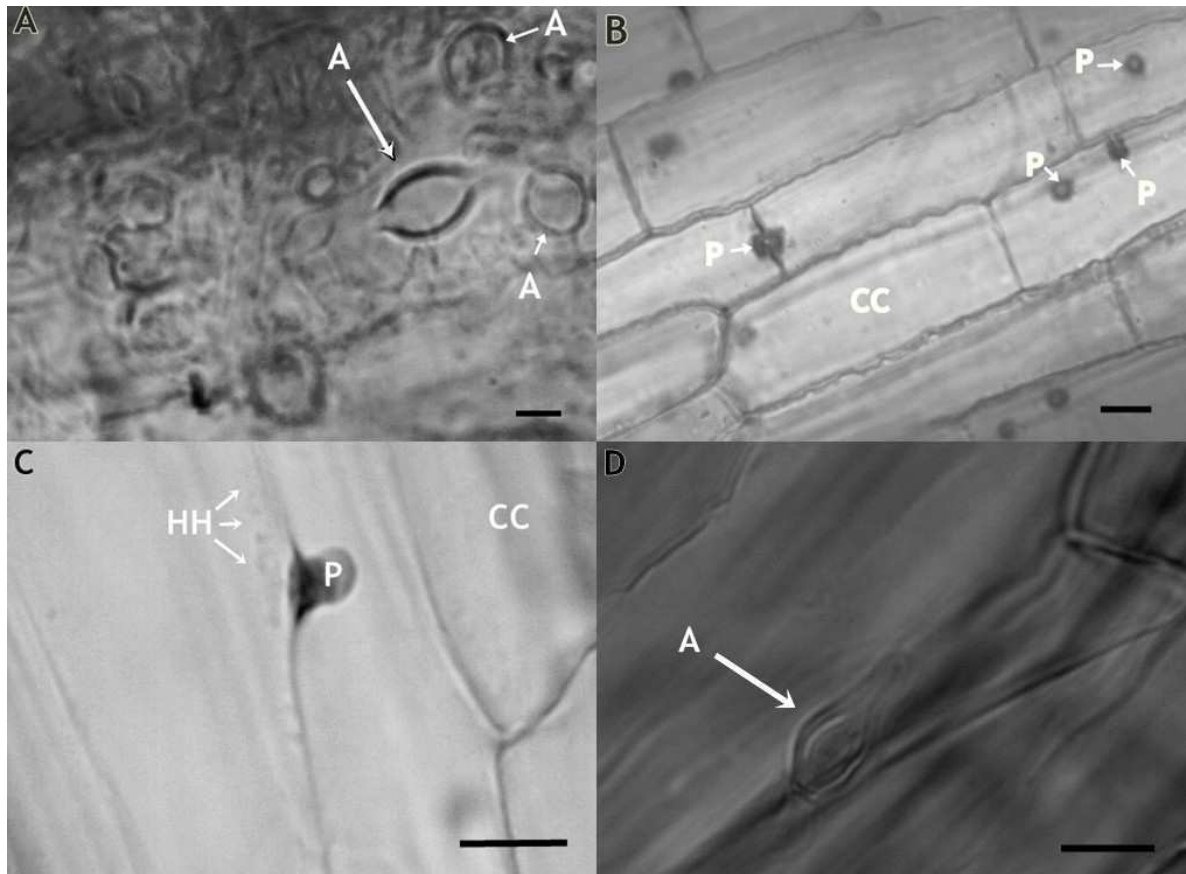


Figura II-2. Raíces de *G. max* en el ensayo de re-síntesis con distintos aislamientos de *Paraphoma radicina*. A, apresorios (A) en la superficie de la raíz. B, papilas (P) formadas frente a la colonización en las células corticales (CC). C, detalle de una papila asociada a una hifa hialina (HH). D, apresorio en la superficie de la raíz, asociado a la unión de dos células epidérmicas. Barra: 10µm.

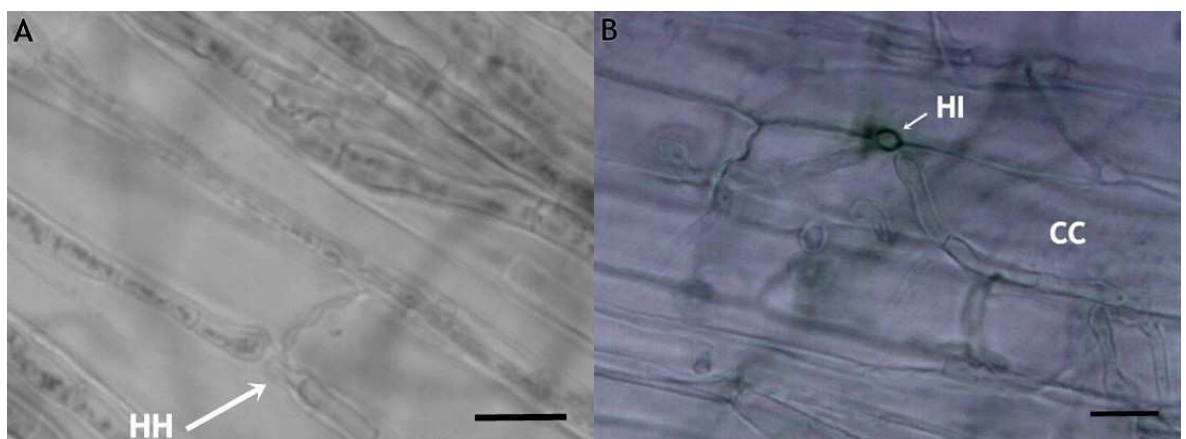


Figura II-3. Raíces de *G. max* en el ensayo de re-síntesis. Infección y colonización de *Paraphoma radicina* (CA 2 3-2). A, en superficie, hifas hialinas (HH) ingresando por la unión de las células. B, hifas intercelulares (HI) colonizando las células corticales (CC). Barra: 10µm.

Uno de los aislamientos (CA 2 3-2) se diferenció del resto por no inducir la producción de papilas, sólo colonizó con hifas intercelulares y el ingreso a la raíz se dio principalmente con finas hifas asociadas a la unión de células epidérmicas (Figura 3 A-B), se observó escasa cantidad de apresorios en la superficie de la raíz (Figura 2 D).

CORYNESPORA CASSICOLA Y CHAETOMIUM SP.

Ambas especies presentaron el mismo patrón de colonización: intensa y localizada, frecuentemente en sectores con presencia de pelos radiculares. En general las hifas se desarrollaron preferentemente en forma perpendicular al eje mayor de la raíz, de modo que las hifas de infección, mediante apresorios, recorrieron desde el cilindro vascular hasta la superficie de la raíz (Figura II-4(B-D)), donde produjeron conidios solamente en el caso de *C. cassicola* (Figura II-4A)

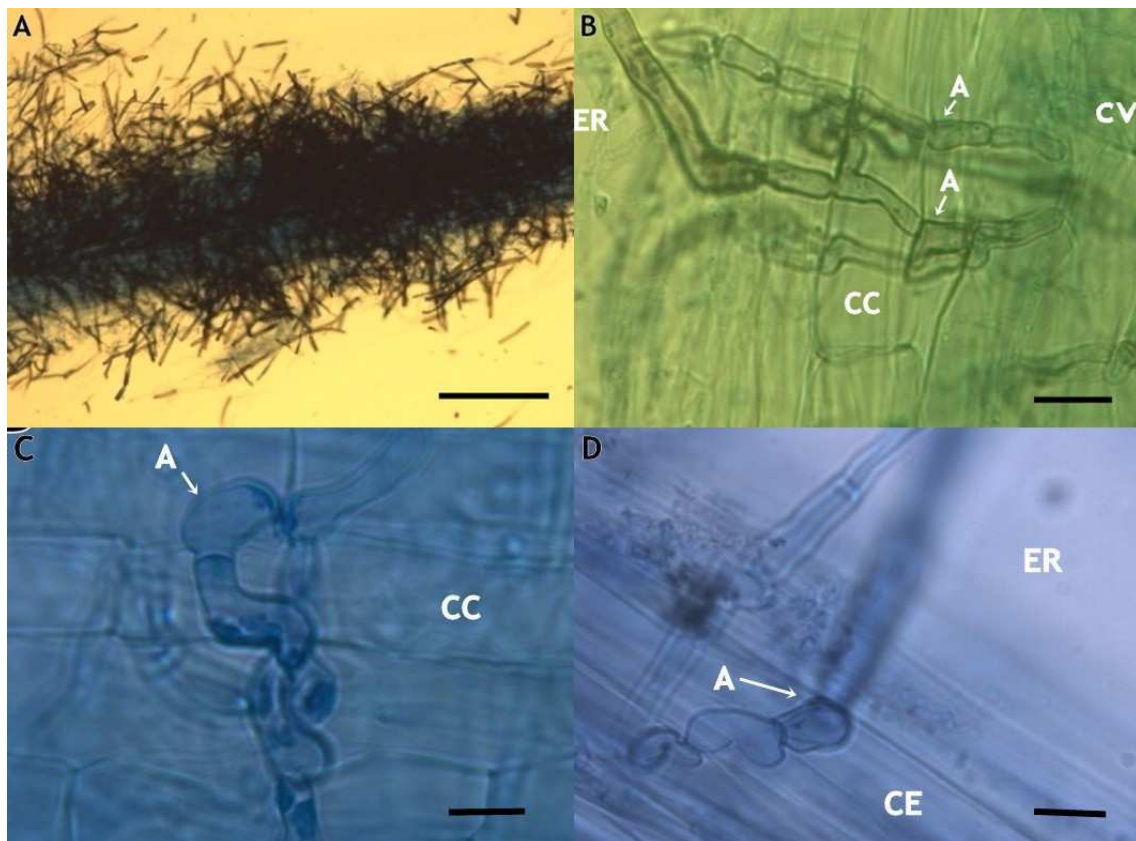


Figura II-4. Raíces de *G. max* en el ensayo de re-síntesis: A. con abundante cantidad de conidios de *Corynespora cassicola* en superficie Barra:100µm. B, colonización de las células corticales (CC) y apresorios (A) de *C. cassicola*, dada desde el cilindro vascular (CV) al exterior de la raíz (ER). C, colonización de la corteza radical, células corticales (CC) con apresorios (A). D, apresorios en las células epidérmicas (CE) y micelio en el exterior de la raíz (ER) de *Chaetomium* sp. Barra:10µm.

ALTERNARIA SP.

Los aislamientos pertenecientes al género *Alternaria* colonizaron la raíz, en forma inter e intracelular, con hifas hialinas y melanizadas, sin alterar la morfología de los tejidos. Las hifas hialinas pudieron ser coloreadas satisfactoriamente con Tripán Blue. En superficie se encontraron hifas asociadas al rizoplasma y formación de apresorios globosos melanizados. En la mayoría de los casos no indujeron la formación de papilas.

Dos aislamientos de *Alternaria alternata* (BA 7 4-2 y BA 21 5-3) y uno de *Alternaria arborescens* (BA XVIII 5-3) incluidos en el grupo 1, presentaron colonización asintomática, con crecimiento tanto perpendicular como paralelo al eje de la raíz. La colonización perpendicular, se caracterizó por la formación de apresorios (Figura II-5(A-D)) e implicó la entrada al interior de las células, mientras que la colonización paralela al eje de la raíz, solamente presentó colonización en los espacios intercelulares (Figura II-5B). En superficie se observaron los conidios y los apresorios globosos ya mencionados (Figura II-5A,C).

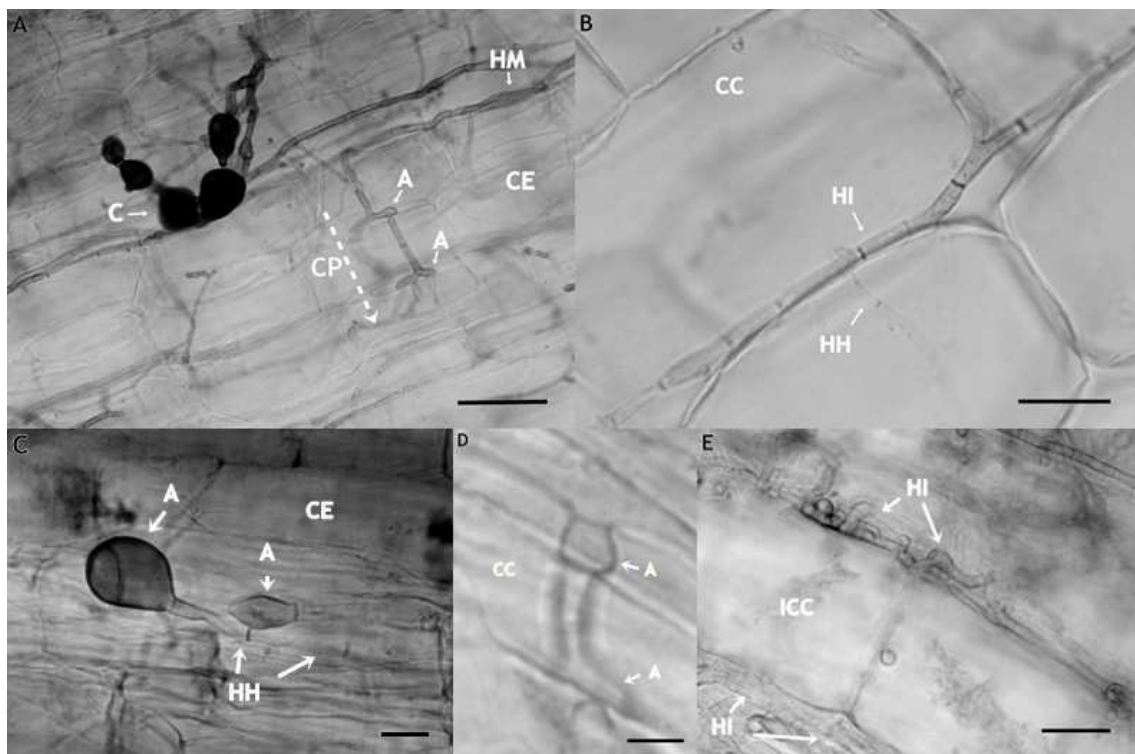


Figura II-5. Raíces de *G. max* en el ensayo de re-síntesis: A, colonización de *Alternaria arborescens* con presencia de conidios. Barra: 50 μ m. (C) sobre células epidérmicas (CE), apresorios (A), hifas melanizadas (HM) y colonización perpendicular (CP). B, colonización de *Alternaria alternata* con hifas intercelulares (HI) e hifas hialinas (HH). C, apresorios melanizados en la superficie de las células epidérmicas de *Alternaria arborescens*. D, detalle los apresorios de en el interior de la raíz, en células de la corteza (CC). E, colonización intensa con hifas intercelulares (HI) de *Alternaria* sp. en el interior de las células corticales (ICC). Barra: 10 μ m.

El aislamiento BA VI 1-1, identificado como *Alternaria* sp, presentó en ciertos sectores colonización intensa (Figura II-6(A-B)), sin embargo no indujo la formación de síntomas de enfermedad, ni la formación de papilas, por ello fue incluido en el grupo 1.

Otro aislamiento identificado como *Alternaria* sp., no indujo síntomas de enfermedad en las plantas, pero se caracterizó por mostrar una colonización intensa, principalmente en los espacios intercelulares. En algunos casos envolvió completamente a las células corticales

El resto de los aislamientos de *A. arborescens* (CA XIII 4-1 y BA 21 4-4), de *A. alternata* (CA 10 5-3, CA 18 5-5, BA IX 1-2, BA 18 4-2, BA 21 1-1 y BA 23 2-2) y de *Alternaria* sp. (CA 18 5-4) deterioraron el estado de la planta. Estos presentaron colonización invasiva y desorganizada, tanto inter como intracelular con formación de apresorios en el interior de la raíz (Figura II-7(A-B)). Dicha colonización se presentó en todos los tejidos de la raíz, incluyendo el cilindro vascular, pero sin inducir la formación de papilas. Además estos aislamientos se encontraron asociados sobre todo, al meristema apical de la raíz y a las raíces laterales y se caracterizaron por inducir el desarrollo de raíces laterales muy próximas entre sí.

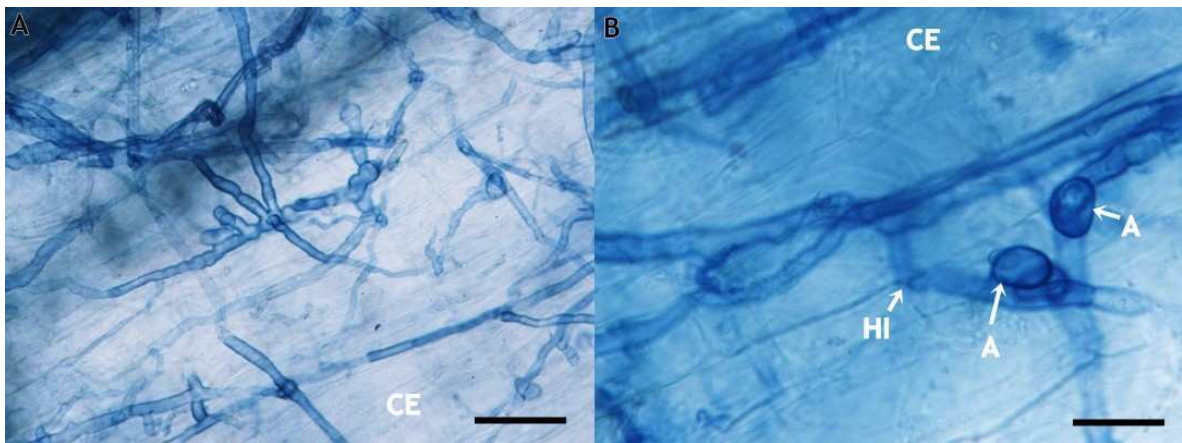


Figura II-6. Raíces de *G. max* en el ensayo de re-síntesis: Colonización intensa de *Alternaria* sp3. A, colonización intensa. B, formación de apresorios (A) e hifas intercelulares (HI).

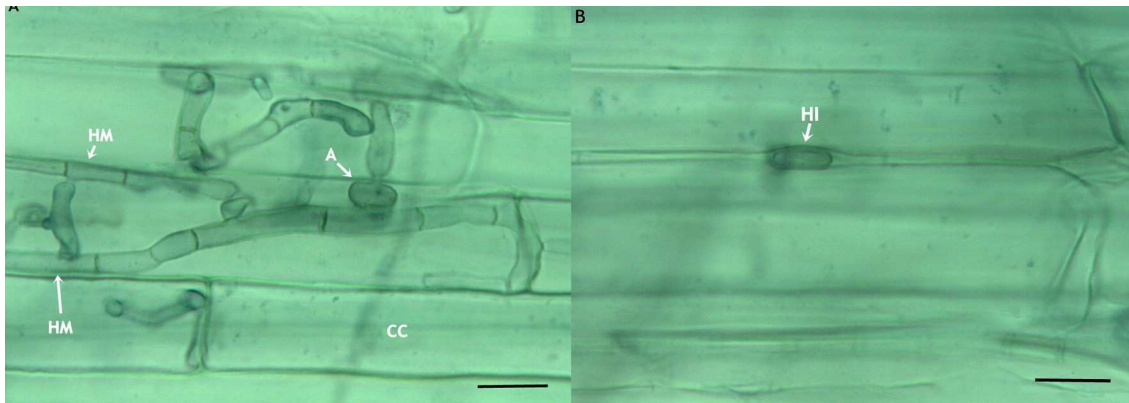


Figura II-7. Raíces de *G. max* colonizada por *Alternaria* sp, presencia de apresorios (A), hifas melanizadas y detalle de hifas intercelulares (HI).

CONIOTHYRIUM CEREALIS

El único aislamiento perteneciente a *Coniothyrium cerealis* (BA XIII 1-1) colonizó las raíces con finas hifas hialinas y desarrollo de algunos apresorios internos (Fig. II-8(A-B)). No se observó presencia de papilas y al igual que en el caso de *P. radicina* resultó complicada la observación de sus hifas de infección debido a la falta de coloración con Tripan Blue. La colonización se mostró principalmente a lo largo del eje mayor de la raíz y a través de los espacios intercelulares.

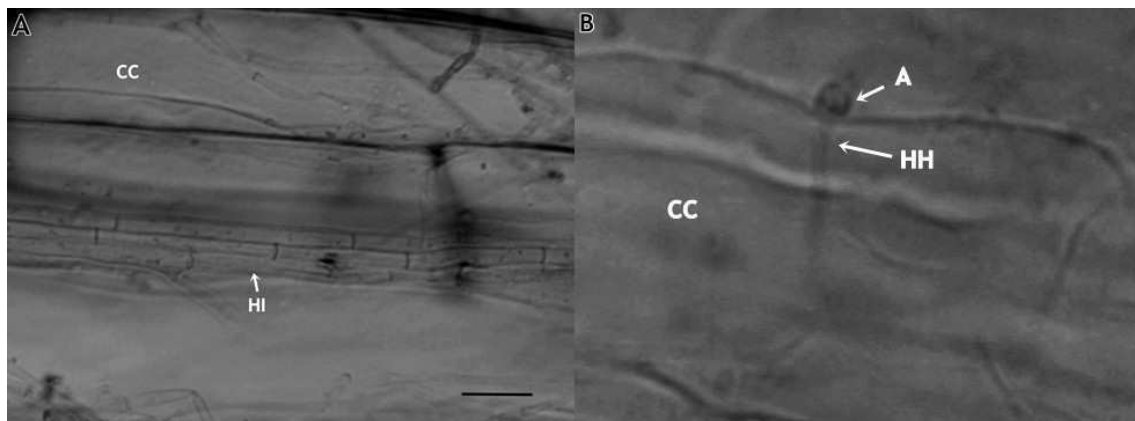


Figura II-8. Raíces de *G. max* colonizadas por *Coniothyrium cereales*. A, hifas creciendo intercelularmente (HI) entre las células corticales (CC). B, apresorio (A) asociado a hifa hialina (HH).

BOEREMIA SP.

Uno de los aislamientos de *Boeremia* sp. (CA XII 1-1) colonizó abundantemente la raíz con hifas melanizadas y formando microesclerocios en el interior de las células (Figura II-9A). No se observaron apresorios ni papilas, pero sí estructuras melanizadas diferenciadas del resto de las hifas vegetativas, que se desarrollaron en la superficie de la raíz entre los pelos radiculares (Figura II-9B).

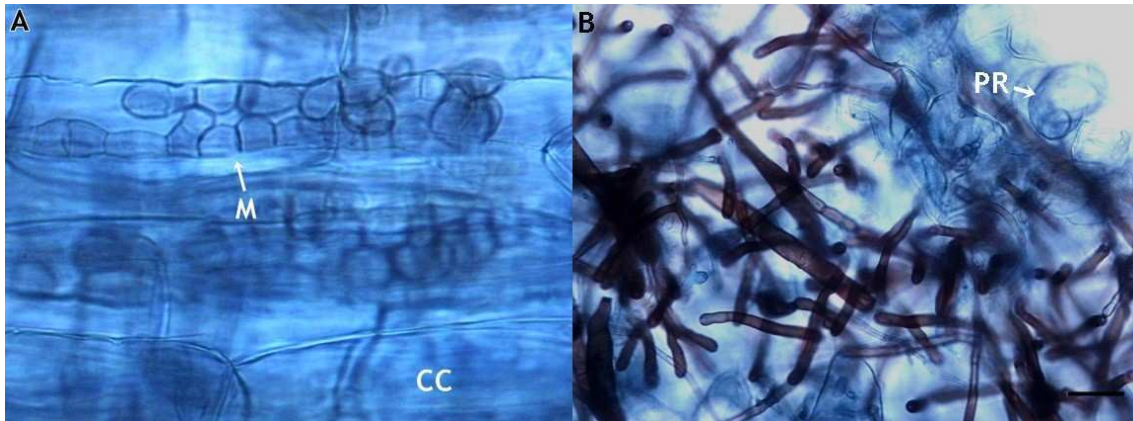


Figura II-9. Raíces de *G. max* colonizadas por *Boeremia* sp. A: microesclerocios (M) en el interior de la corteza. B, estructuras melanizadas diferenciadas del resto de las hifas vegetativas presentes en la superficie de la raíz y desarrollados en proximidades de los pelos radiulares (PR).

PHAEOSPHAERIA SP. Y MONODYCTIS SP.

Los aislamientos BA IX 1-3 de *Phaeosphaeria* sp. y BA 4 3-4 de *Monodyctis* sp. colonizaron intensamente la raíz, lo que dificultó las observaciones. En ambos casos se observó numerosa cantidad de apresorios en superficie y se caracterizaron por originar una marcada desorganización del tejido cortical. Sin embargo, no alteraron el aspecto general de la planta, por lo que fueron incluidos en el grupo 2. En la Figura II-10 se muestran las hifas de colonización.

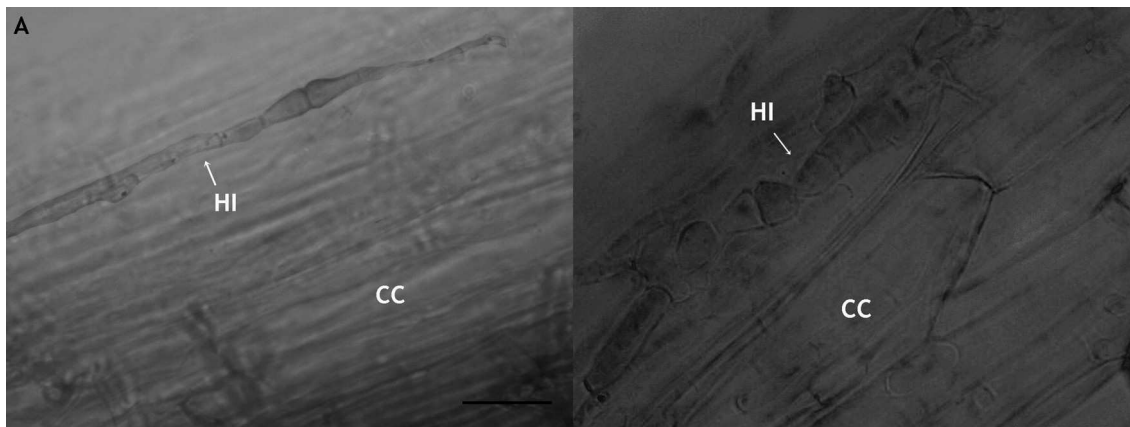


Figura II-10. Raíces de *G. max* mostrando hifas intercelulares (HI) en células corticales (CC) de: A, *Monodyctis* sp. y B, *Phaeosphaeria* sp.

CLADOSPORIUM SPHAEROSPERMUM.

El único aislamiento identificado como *Cladosporium sphaerospermum* colonizó las raíces principalmente con hifas intercelulares que siguieron a lo largo del eje mayor de la raíz (Figura II-11A,B), sin originar ningún tipo de alteración en los tejidos. Presentó la particularidad de colonizar abundantemente en superficie, dando origen a un manto (Figura II-11C). Éste estuvo especialmente asociado a los ápices meristemáticos. Sin

embargo, cabe destacar que el hongo no alteró la morfología de la raíz. Además, frecuentemente fueron observados estructuras reproductivas en sectores de las raíces correspondientes a la zona pilífera de las mismas. Este aislamiento fue incluido en el grupo 1.

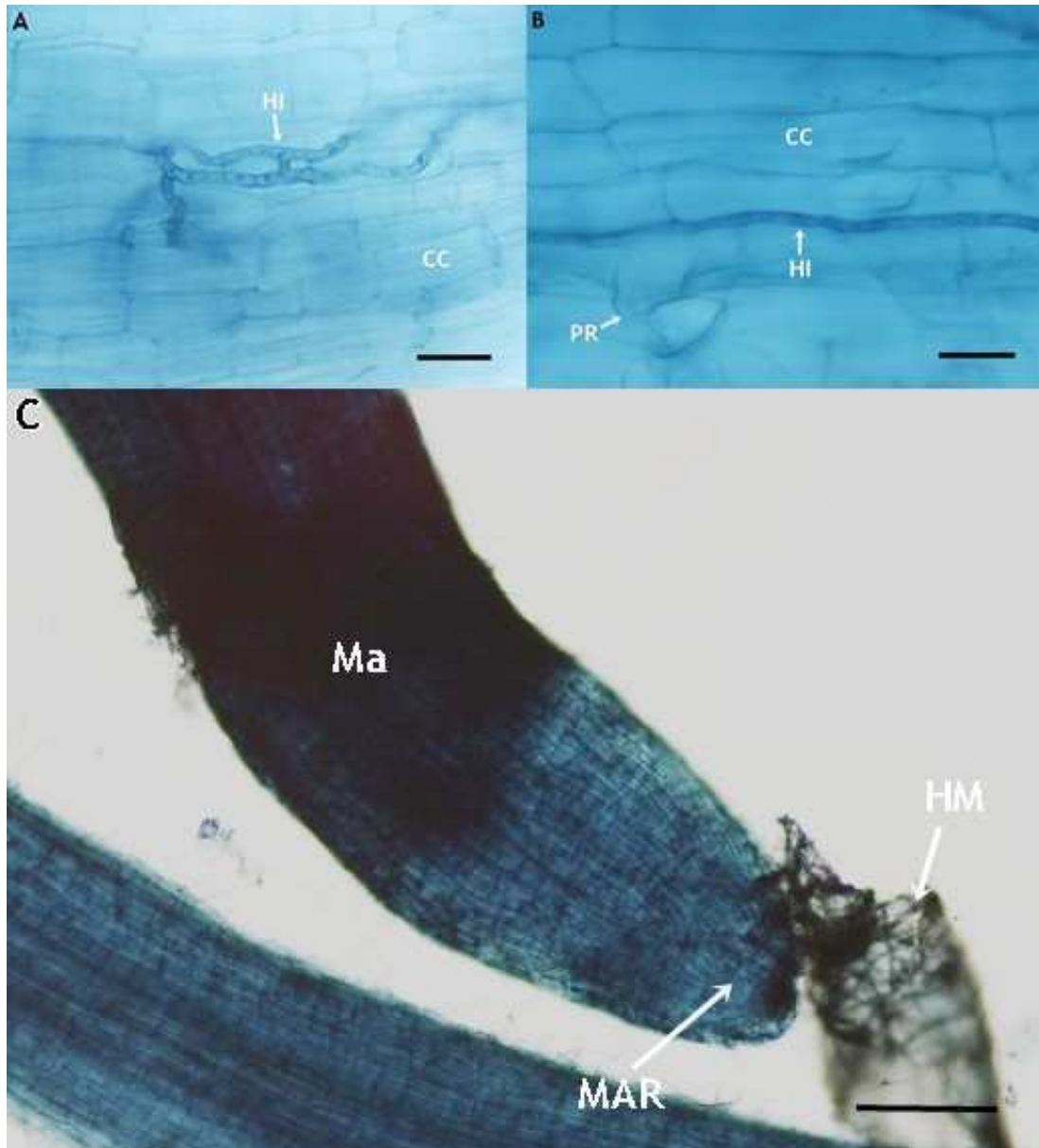


Figura II-11. Raíces de *G. max* colonizadas por *Cladosporium sphaerospermum*: A y B, hifas intercelulares (HI) entre las células corticales (CC). C, aspecto de la raíz con manto (Ma) formado por las hifas melanizadas (HM), asociado al meristema apical de la raíz (MAR).

HUMICOLA FUSCOATRA

En el grupo 1 también fue incluido el aislamiento de *Humicola fuscoatra*, que colonizó las raíces con hifas hialinas y desarrolló conidios en el interior de las células (Figura II-12B), los que se encontraron dispersos uniformemente en los tejidos más

externos de la raíz (rizodermis y capas adyacentes de la corteza radical). La colonización se observó principalmente en los ápices de las raíces laterales (Figura II-12A).

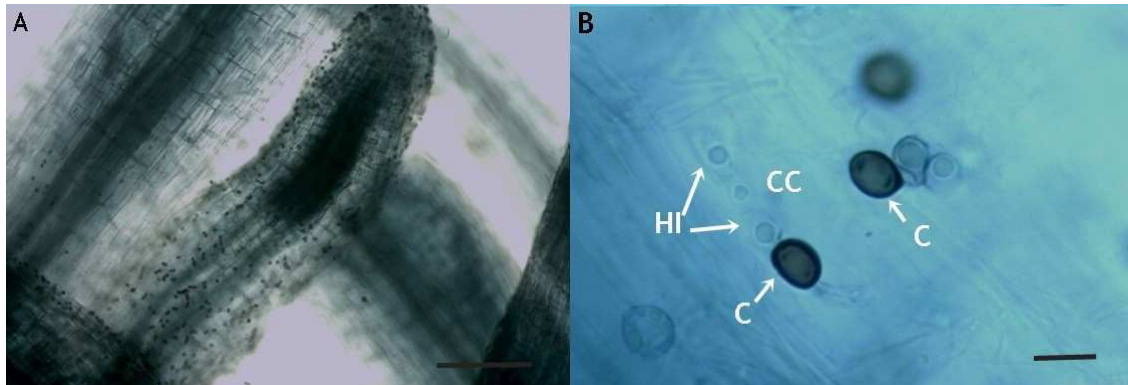


Figura II-12. Raíces de *G. max* colonizadas por *Humicola fuscoatra*. A, aspecto general de la raíz. B, conidios (C) e hifas hialinas (HH) en células corticales (CC).

PEYRONELLAE SP.

Dos de los aislamientos de *Peyronellae* sp. (BA VII 5-1 y CA XVIII 4-2) presentaron el mismo patrón de colonización, con abundante cantidad de clamidosporas melanizadas que ocuparon el interior de las células vegetales. Dicha colonización comprendió todos los tejidos radiculares, desde la capa más externa (rizodermis) a la más interna (cilindro vascular). Las clamidosporas se encontraron asociadas tanto a hifas hialinas como a hifas melanizadas (Figura II-13)

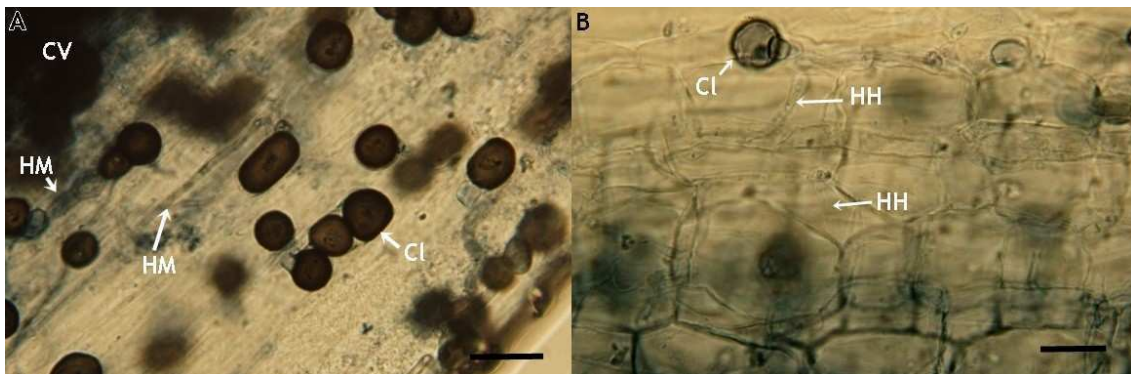


Figura II-13. Colonización de *Peyronellae* sp. A, clamidosporas (Cl) en el interior de las células corticales e hifas melanizadas (HM) de colonización. B, clamidospora (Cl) en la superficie de la raíz e hifas hialinas (HH) en el espacio intercelular de la raíz.

AISLAMIENTOS NO IDENTIFICADOS

El aislamiento BA9 2.2 (morfortipo 7) ocupó los espacios intercelulares con clamidosporas en cadena, que se colorearon satisfactoriamente con Tripán Blue y que se encontraron asociadas a hifas hialinas. Dicha colonización ocupó únicamente la rizodermis y las capas más externas de la corteza. En ocasiones se observó colonización intracelular (Figura II-14(A-D)).

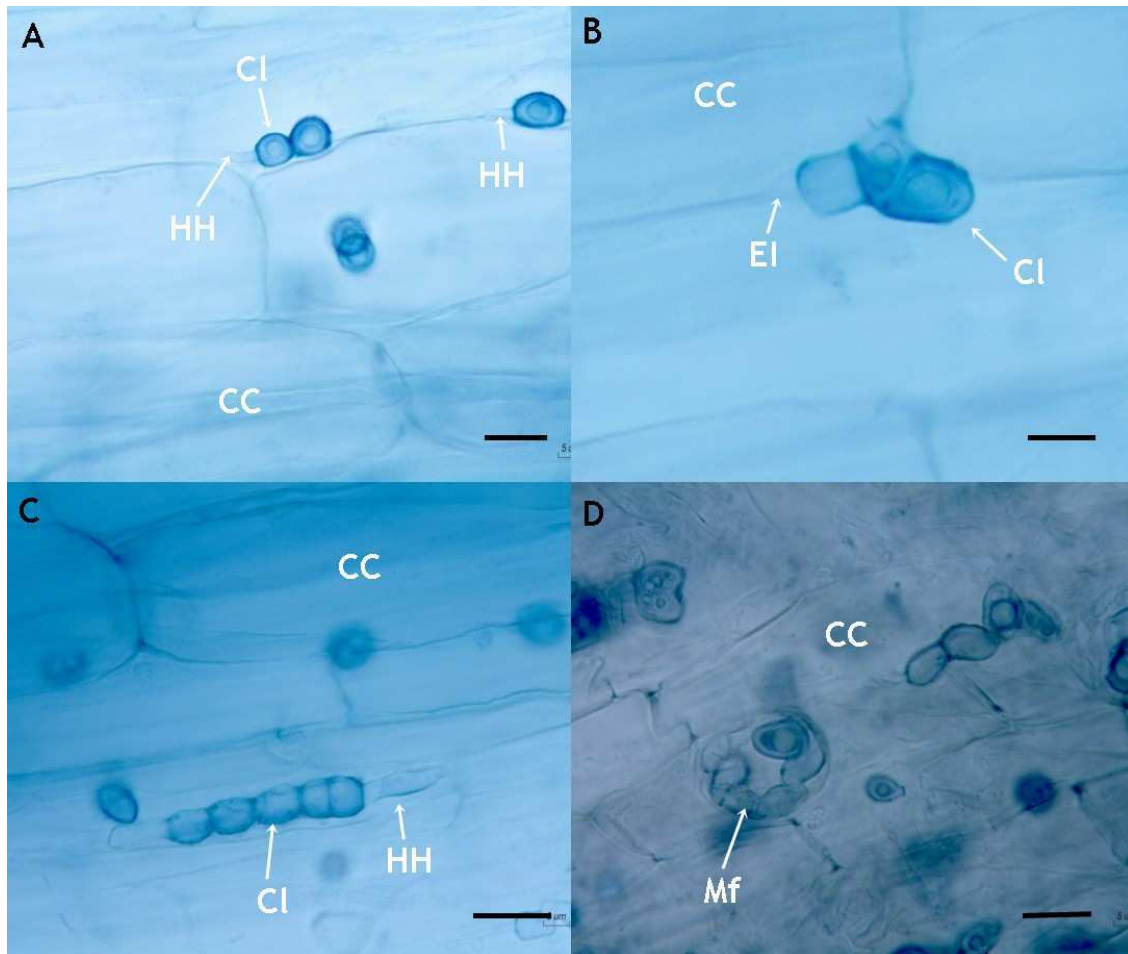


Figura II-14. Raíces de *G. max* colonizadas por BA 9 2-2 en la corteza. A, clamidosporas (CI) e hifas hialinas (HH). B, clamidospora en el espacio intercelular (EI). C, cadenas de clamidosporas asociadas a hifas hialinas. D, microesclerocio en formación en las células corticales (CC).

El aislamiento CA I 1-3 (morfortipo 1) creció en forma intercelular e intracelular, tanto con hifas hialinas como melanizadas, sin alterar la morfología de los tejidos. Las hifas hialinas fueron satisfactoriamente coloreadas con Tripán Blue. En superficie se encontraron hifas melanizadas asociadas al rizoplaneo (Figura II-15B). Además se observaron microesclerocios en formación y estructuras de ingreso, sin la formación de un apresorio, en la superficie de la raíz (Figura II-15(A-B)).

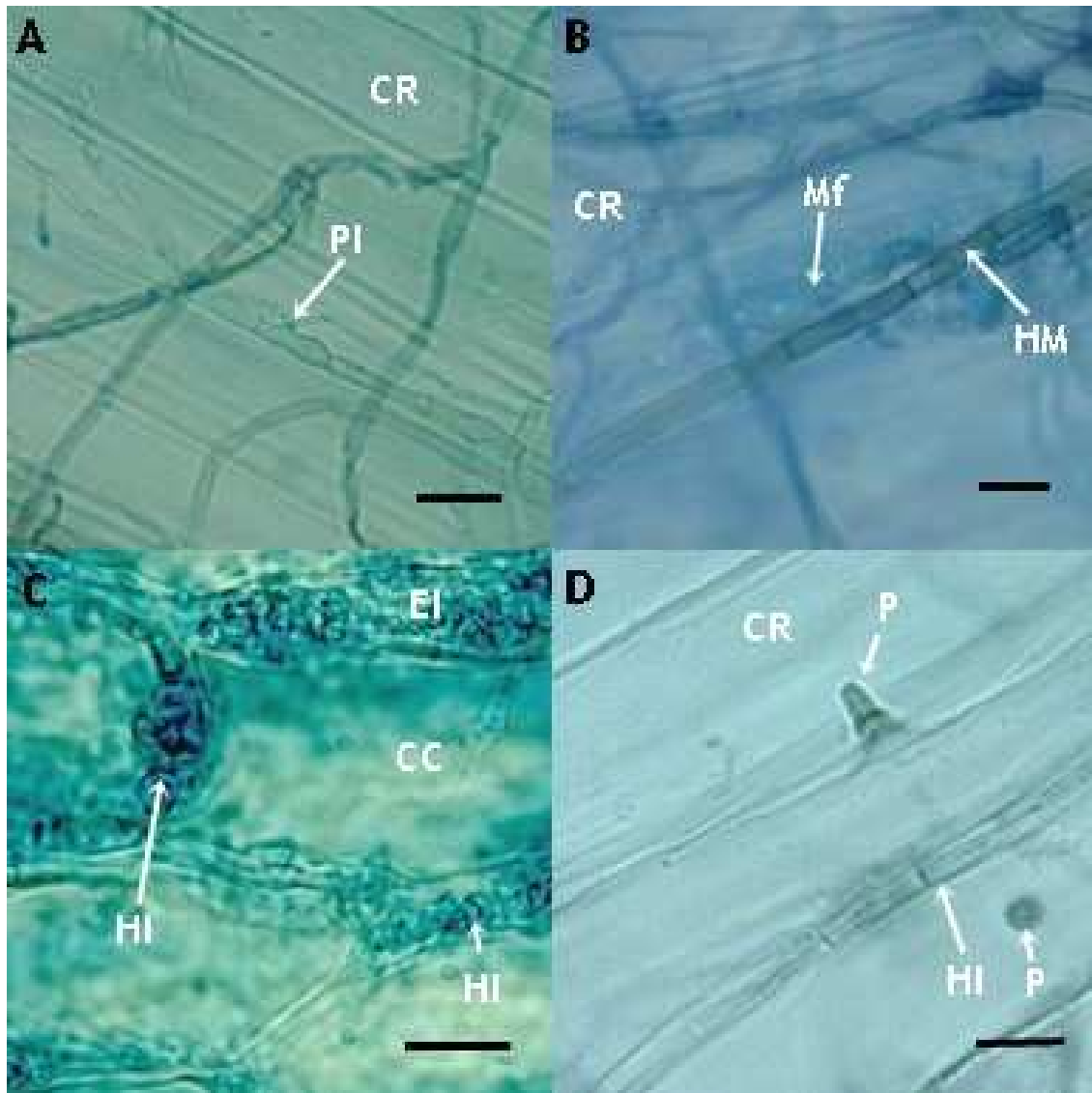


Figura II-15. Raíces de *G. max* colonizadas por distintos aislamientos no identificados: A, Superficie de la raíz con CA I 1-3, punto de ingreso (PI) en células de la rizodermis (CR). B, hifas melanizadas en superficie (HM) y microsclerocio en formación (Mf) en células de la rizodermis (CR). C, hifas de CA IX 1-4 en el espacio intercelular (EI). D, superficie de la raíz con hifas intercelulares (HI) de BA XIII 1-2 en células de la rizodermis (CR).

El aislamiento CA IX 1-4 (morfotipo 2), colonizó intensamente los espacios intercelulares con finas hifas, alterando la anatomía de la raíz, ya que se observaron los espacios intercelulares considerablemente engrosados (Figura 15C).

El endofito BA XIII 1-2 (morfotipo 6) colonizó la corteza radical con hifas hialinas, difíciles de distinguir, que indujeron la formación de papilas. La presencia de dichas papilas favoreció la observación de las hifas (Figura II-15D).

ACTIVIDAD DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS, AIA Y SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO

Los resultados de la actividad de enzimas hidrolíticas y la producción de AIA, de los aislamientos dematiáceos, se presentan en la Tabla II-3. Con respecto a la solubilización de fósforo inorgánico, ninguno de los aislamientos mostró esta capacidad en las condiciones evaluadas.

Tabla II-3. Los símbolos expresados corresponden a las cuantificaciones realizadas de las actividades de enzimas hidrolíticas, para cada enzima corresponde a un rango de actividad expresado en μmol de azúcar reductor / h. ml^{-1} . Los símbolos indican: + (0.1 a 1); ++ (1 a 2); +++ (> a 2).

| Código del aislamiento | Enzimas hidrolíticas | | | AIA |
|------------------------|----------------------|--------------|------------------------|-----|
| | Endoglucanasa | Exoglucanasa | Polimetilgalacturonasa | |
| CA XIV 4-2 | (+++) | (++) | (+) | (+) |
| CA 2 3-2 | (-) | (+) | (+) | (-) |
| BA XVI 2-5 | (+) | (-) | (-) | (-) |
| BA 3 2-1 | (-) | (+++) | (-) | (+) |
| BA 5 2-1 | (+) | (++) | (+) | (-) |
| BA 13 1-1 | (-) | (++) | (+) | (-) |
| BA 13 5-4 | (+) | (++) | (+) | (-) |
| BA 19 3-1 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| BA IX 1-3 | (+) | (+) | (-) | (-) |
| BA XIII 1-1 | (-) | (-) | (+) | (-) |
| CA 10 5-3 | (+) | (+++) | (+) | (-) |
| CA 18 5-5 | (+) | (-) | (++) | (+) |
| BA IX 2-1 | (+) | (+) | (++) | (+) |
| BA 7 1-1 | (+) | (+++) | (+) | (-) |
| BA 7 4-2 | (+) | (++) | (++) | (+) |
| BA 11 2-1 | (+) | (+) | (++) | (-) |
| BA 18 4-2 | (+) | (+) | (+) | (-) |
| BA 21 1-1 | (+) | (+) | (-) | (+) |
| BA 21 5-3 | (+) | (+) | (++) | (-) |
| BA 23 2-2 | (-) | (+) | (-) | (+) |
| CA XIII 4-1 | (++) | (+++) | (-) | (-) |
| BA XVIII 5-3 | (+) | (++) | (++) | (-) |
| BA 21 4-4 | (++) | (+) | (++) | (-) |
| CA 16 4-1 | (++) | (+) | (++) | (-) |
| CA 18 5-4 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| BA VI 1-1 | (++) | (+) | (+) | (-) |
| BA 4 3-4 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| CA XII 1-1 | (+) | (-) | (-) | (-) |
| CA XVIII 3-1 | (-) | (+) | (+) | (-) |
| CA XVIII 4-2 | (-) | (+) | (++) | (-) |

| | | | | |
|-------------|-------|------|-------|-----|
| BA I 1-4 | (++) | (+) | (+) | (-) |
| BA VII 5-1 | (+) | (++) | (-) | (-) |
| CA III 1-3 | (+) | (+) | (++) | (-) |
| CA III 3-2 | (-) | (-) | (+) | (-) |
| CA 16 5-4 | (-) | (++) | (-) | (+) |
| BA 8 2-2 | (++) | (++) | (+) | (-) |
| BA 4 3-5 | (+) | (++) | (-) | (-) |
| CA XXI 3-1 | (+++) | (+) | (+) | (-) |
| CA IV 1-1 | (+) | (-) | (-) | (-) |
| BA VII 1-2 | (++) | (++) | (+) | (+) |
| CA I 1-3 | (-) | (-) | (+) | (-) |
| CA IX 1-4 | (+) | (+) | (+) | (-) |
| CA XVI 1-5 | (+) | (+) | (+) | (-) |
| CA 18 3-2 | (++) | (+) | (+++) | (+) |
| CA 20 4-4 | (++) | (++) | (+) | (-) |
| BA XIII 1-2 | (+) | (+) | (++) | (+) |
| BA 9 2-2 | (-) | (+) | (++) | (-) |

1Debido a los bajos valores obtenidos, las actividades enzimáticas se expresaron por hora.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

De los aislamientos obtenidos y evaluados mediante la resíntesis, el 26 % se comportó como endofitos en sentido estricto (categoría 1), los que no provocaron síntomas de enfermedad ni reacción de defensa de su hospedante (Figura II-16). El 17% no afectó el aspecto de la planta, sin embargo, alteró la morfología de la raíz, en algunos casos induciendo el desarrollo de papilas y en otros provocando desorganización del tejido radicular (categoría 2). El grupo más abundante (40%), incluye los aislamientos que indujeron síntomas de enfermedad en *G. max* (categoría 2), entre los más comunes se encontraron, micelio blanquecino en el ápice del vástago, hojas cloróticas, marchitamiento, disminución del tamaño de la planta y caída temprana de hojas. El 17 % restante, se comportó como necrótrofos (categoría 4), los que provocaron la muerte de las plantas y produjeron pudrición blanda. En la Figura II-17, se encuentra representada la proporción de los integrantes de cada grupo que presentaron las capacidades enzimáticas evaluadas, donde aquellos aislamientos que fueron incluidos en la categoría 1 (endofitos en sentido estricto) fueron los que menos actividades enzimáticas presentaron, en contraste, todos los aislamientos incluidos en la categoría 4 (necrótrofos), presentaron todas las actividades enzimáticas evaluadas.

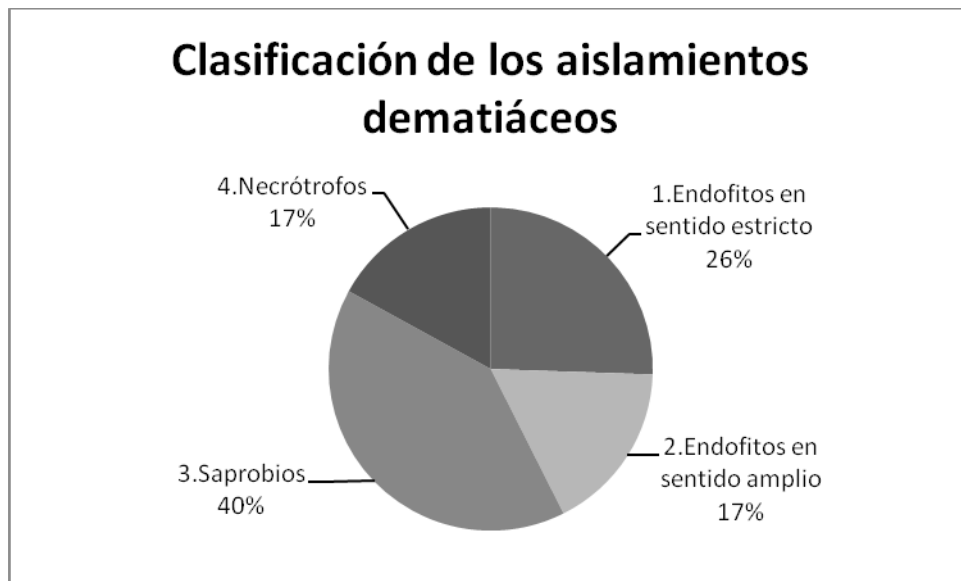


Figura II-16. Porcentaje de los aislamientos dematiáceos que comprenden las categorías en las que fueron clasificados según el tipo de interacción.

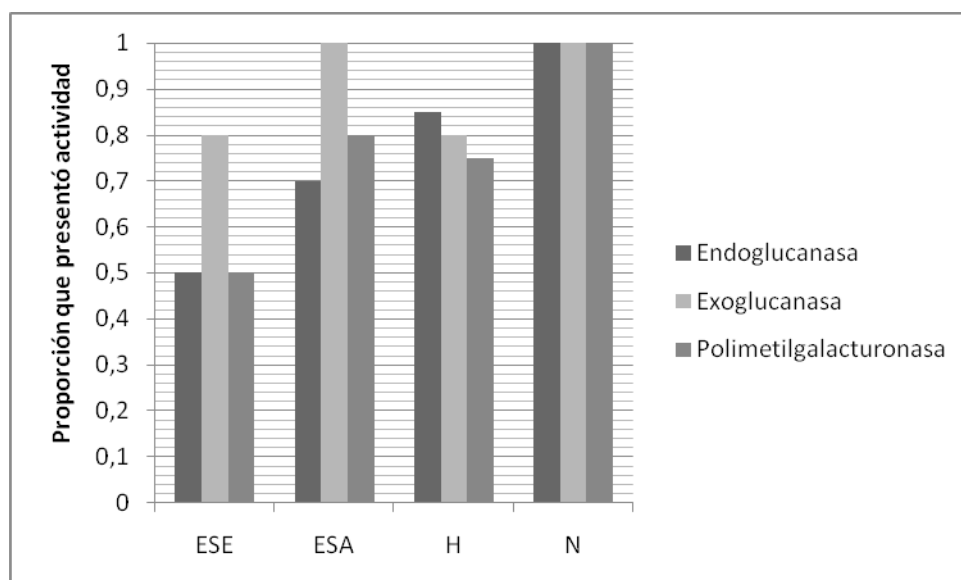


Figura II-17. Proporción de aislamientos que presentaron las actividades enzimáticas evaluadas (endoglucanasa, exoglucanasa, polimetilgalacturonasa), según las categorías, ESE (endofito en sentido estricto), ESA (endofito en sentido amplio), H (hemibiótrofo) y N (necrótrofo).

En la resíntesis se observó un amplio rango de respuestas, incluso en aislamientos de la misma especie. Las dos especies más frecuentemente aisladas fueron *Alternaria alternata* y *Paraphoma radicina*. Ambas presentaron gran diversidad de respuestas sobre su hospedante, y fueron incluidas en tres de las categorías. En el caso de *Alternaria alternata* la categoría más representativa fue la 3 y ninguno fue incluido en la categoría 2 (Figura II-18), en cambio la categoría más representativa de *Paraphoma radicina* fue la 2 y ninguno fue incluido en la categoría 4 (Figura II-19).

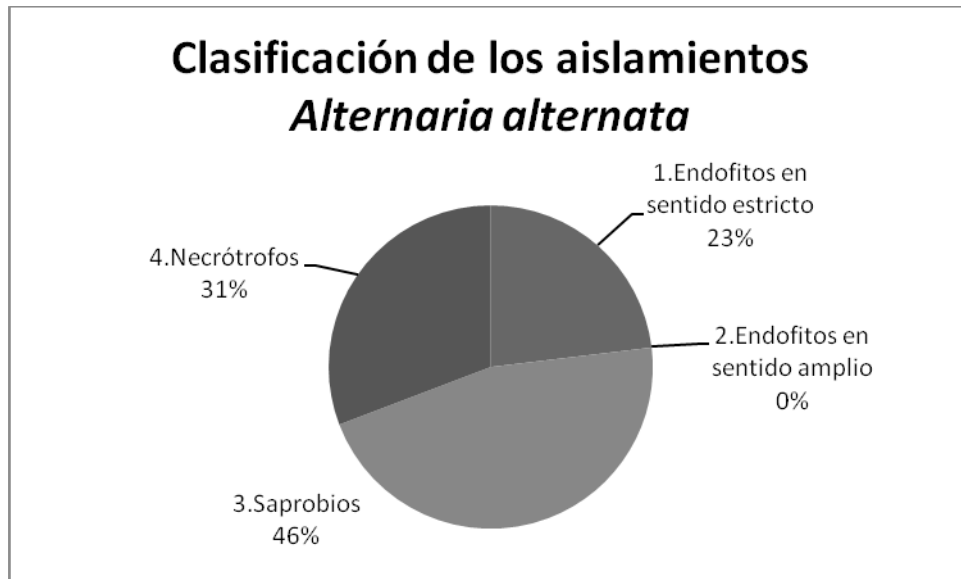


Figura II-18. Porcentaje de aislamientos de *Alternaria alternata* clasificados según según el tipo de interacción.

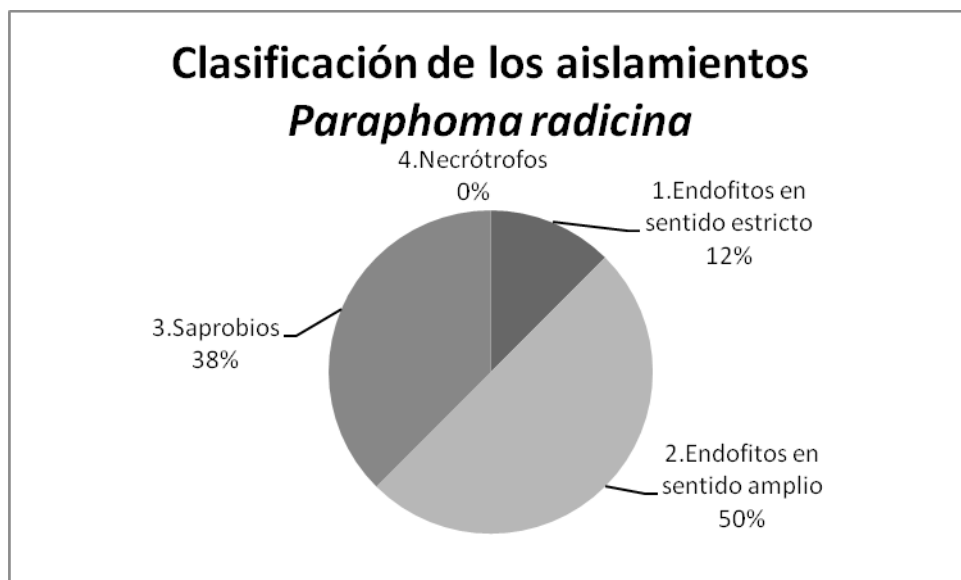


Figura II-19. Porcentaje de aislamientos de *Paraphoma radicina* clasificados según según el tipo de interacción.

Comparando las capacidades enzimáticas de las categorías 1 y 4, las que corresponden a los comportamientos que más difieren entre sí, se pudo observar que los endofitos pertenecientes al género *Alternaria* presentan un perfil enzimático diferente al resto de los endofitos (Tabla II-4): presentan las tres capacidades enzimáticas evaluadas. A partir de estos resultados se realizó un nuevo análisis discriminante excluyendo los aislamientos de dicho género (Figura II-20), encontrando de este modo, que el resto de los endofitos (categoría 1) se agrupan a la izquierda del

gráfico, aunque no forman un grupo separado del resto. Este agrupamiento está dado principalmente por no poseer actividad endoglucanasa. El resto de las categorías continuaron solapadas entre sí.

La producción de AIA no estuvo asociada a ninguna categoría en especial, ya que no se observó diferencias significativas entre las categorías.

Tabla II-4. Comparación realizada entre los endofitos en sentido estricto (categoría 1) y los necrótrofos (categoría 4) según sus capacidades enzimáticas (endoglucanasa, exoglucanasa y polimetilgalacturonasa) y su capacidad para producir ácido indol acético (AIA). Los símbolos corresponden a las cuantificaciones realizadas de las actividades de enzimas hidrolíticas. Para cada enzima el símbolo corresponde a un rango de actividad expresado en μmol de azúcar reductor / h. ml.

| | Código del aislamiento | Enzimas hidrolíticas | | | AIA | |
|-------------|------------------------------------|----------------------|--------------|------------------------|------|-----|
| | | Endoglucanasa | Exoglucanasa | Polimetilgalacturonasa | | |
| ENDOFITOS | <i>Paraphoma radicina</i> | CA 2 3-2 | (-) | (+) | (+) | |
| | <i>Coniothyrium cereals</i> | BA XIII 1-1 | (-) | (-) | (-) | |
| | <i>Alternaria alternata</i> | BA 7 4-2 | (+) | (++) | (++) | (+) |
| | <i>Alternaria alternata</i> | BA 21 5-3 | (+) | (+) | (++) | (-) |
| | <i>Alternaria arborecens</i> | BA XVIII 5-3 | (+) | (++) | (++) | (-) |
| | <i>Alternaria sp 3</i> | BA VI 1-1 | (++) | (+) | (+) | (-) |
| | <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | CA 16 5-4 | (-) | (++) | (-) | (+) |
| | <i>Humicola fuscoatra</i> | CA IV 1-1 | (+) | (-) | (-) | (-) |
| | morfotipo 1 | CA I 1-3 | (-) | (-) | (+) | (-) |
| | morfotipo 7 | BA 9 2-2 | (-) | (+) | (++) | (-) |
| NECRÓTROFOS | <i>Alternaria alternata</i> | BA 7 1-1 | (+) | (+++) | (+) | (-) |
| | <i>Alternaria alternata</i> | BA 11 2-1 | (+) | (+) | (++) | (-) |
| | <i>Curvularia trifolii</i> | BA 4 3-4 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| | <i>Peyronellae sp.</i> | BA I 1-4 | (++) | (+) | (+) | (-) |
| | <i>Macrophomina phaseolina</i> | BA 8 2-2 | (++) | (++) | (+) | (-) |
| | <i>Humicola grisea</i> | CA XXI 3-1 | (+++) | (+) | (+) | (-) |
| | morfotipo 3 | CA XVI 1-5 | (+) | (+) | (+) | (-) |
| | morfotipo 5 | CA 20 4-4 | (++) | (++) | (+) | (-) |

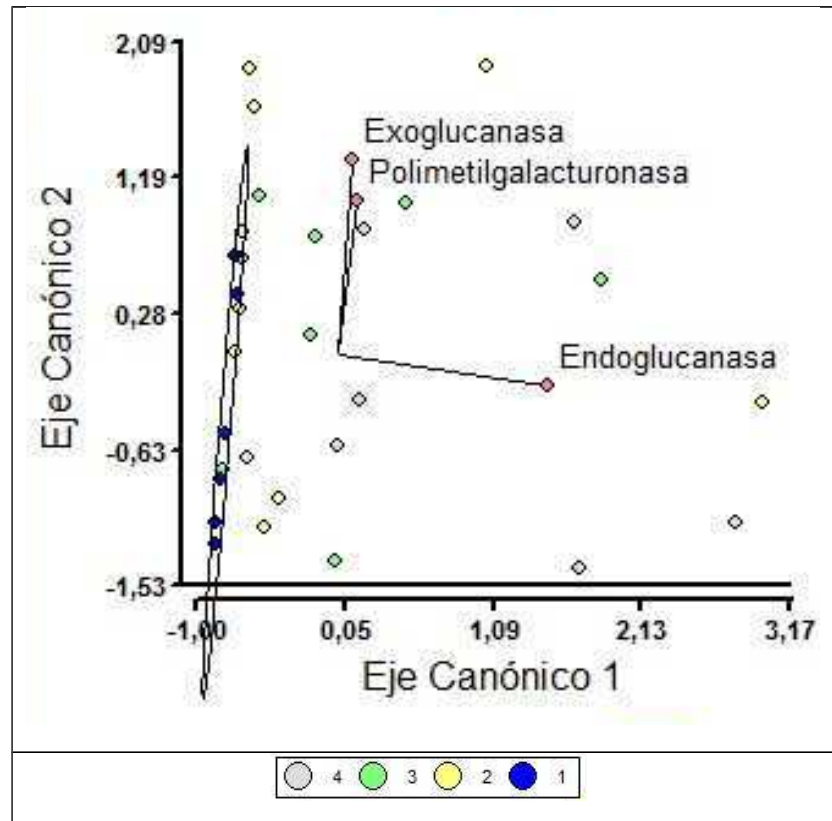


Figura II-20. Análisis discriminante realizados con las capacidades enzimáticas (endoglucanasa, exoglucanasa y polimetilgalacturonasa), los grupos corresponden a las categorías que resultaron de la resíntesis. Con los dos ejes canónicos presentados se explica el 99% de la variabilidad.

DISCUSIÓN

El sistema utilizado en la resíntesis, si bien no imita las condiciones de campo, resultó adecuado para los fines perseguidos en este estudio, centrados en confirmar y describir el carácter endofítico y clasificar los endofitos dematiáceos aislados, según el tipo de interacción que tienen con su hospedante natural en condiciones *in vitro*.

Los endofitos son microorganismos que colonizan inter y/o intracelularmente tejido vegetal sano, persistiendo por todo o parte del ciclo de vida de la planta sin causarle síntomas de enfermedad (Petrini, 1991; Wilson, 1995). Aún cuando la técnica empleada para el aislamiento es adecuada para aislar específicamente hongos endofíticos cultivables (Silvani y col. 2008), en la resíntesis no todos los hongos aislados se comportaron de este modo, sólo el 26% de los hongos aislados lo hicieron y fueron incluidos en la categoría 1: endofitos en sentido estricto.

La pared celular de las plantas, además de ser una barrera pasiva premodelada que limita el acceso de patógenos a las células vegetales, se modifica y refuerza específicamente en sitios concretos frente a la detección de potenciales patógenos. El refuerzo activo de la pared celular, denominado papilas, es una respuesta temprana a la percepción de las numerosas categorías de agentes patógenos, incluyendo hongos y bacterias (Underwood, 2012). La categoría endofitos en sentido estricto de este trabajo incluyó únicamente a los hongos que fueron capaces de colonizar las raíces de *G. max* sin activar esta respuesta temprana de defensa de las plantas ni provocar síntomas de enfermedad. Dentro de este tipo fueron clasificados *Paraphoma radicina*, *Coniothyrium cerealis*, *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens*, *Alternaria* ssp., *Humicola fuscoatra*, *Cladosporium sphaerospermum* y los aislamientos CA I 1-3 y BA 9 2-2, que no pudieron ser identificados. Todos ellos se caracterizaron por la colonización del interior de la raíz, a través de hifas septadas, principalmente hialinas, pero en algunos de los casos melanizadas, al encontrarse asociadas a la superficie de la raíz. Sólo dos de estos hongos presentaron estructuras que fueron descritas como microesclerocios en formación, aún cuando éstos constituyen una de las características más distintivas de los hongos DSE (Addy y col. 2005; Barrow 2003). Sin embargo, algunas de estas (CA I 1-3 y BA 9 2-2) dieron origen a estructuras semejantes a vesículas y clamidosporas hialinas y en distintos estados de melanización, estructuras

que han sido consideradas por Mandyam y Jumpponen (2008) como estados iniciales de microesclerocios. Una variedad de estados desde vesículas hialinas a vesículas con distinto grado de melanización también fueron descritos al analizar los resultados de re-síntesis de distintas cepas hongos DSE pertenecientes a especies de *Periconia* y *Microdochium* y también en otros aislamientos no identificados, en plantas de puerro. Sin embargo, las vesículas no se observaron al realizar la re-síntesis en su hospedante natural, *Andropogon gerardii* (Mandyam y col. 2010). Walker y col. (2011) describieron hongos DSE que fueron incluidos en el complejo *Phialocephala-Acephala*, que no fueron capaces de dar origen a microesclerocios produciendo en su lugar, gruesas estructuras ligeramente pigmentadas semejantes a coils.

Aunque en cultivo todos los aislamientos presentan hifas melanizadas, en el interior de las raíces predominaron las hifas hialinas. Como se mencionó, Barrow y Aaltonen (2001) al observar raíces de *Atriplex canescens* en dos estados fisiológicos diferentes de plantas activas y latentes, encontraron que las hifas hialinas y la acumulación de lípidos resultaron más prevalentes en las raíces de las plantas fisiológicamente activas, en contraste con la gran abundancia de hifas melanizadas y microesclerocios en las raíces de las plantas latentes y fisiológicamente inactivas. En el mismo sentido Yu y col. (2001) también mostraron que los microesclerocios formado por *Phialocephala fortinii* dentro de células de la raíz de *Asparagus officinalis* contenían depósitos de glucógeno, proteínas, y polifosfatos, lo que sugiere que estas estructuras pueden actuar como propágulos. Estas observaciones coinciden con nuestros resultados, donde la observación de las raíces se realizó en plantas de 30 días, en activo desarrollo, en las que quizás la melanización de las hifas y la formación de los microesclerocios constituya una etapa aún no alcanzada en el ciclo del hongo y que podría originarse en estadios fenológicos posteriores. Para determinarlo sería necesario realizar la resíntesis y observar las raíces a lo largo todo el ciclo de vida de *G. max*. Sin embargo, la ausencia de micoesclerocios puede ser de importancia, si se tiene en cuenta que éstos han sido consideradas no sólo estructuras de latencia, sino también de propagación (Peterson 2008; Upson y col. 2009).

Con respecto a las formas de ingreso al sistema radicular, al observar las raíces del ensayo de resíntesis encontramos dos modos de infección. El más común se caracterizó por la formación de apresorios, pero también se observó el ingreso por medio de finas

hifas. Estas dos formas de ingreso al hospedante ya fueron citadas en hongos DSE. Este es el caso de *Phialophora fortinii*, una de las especies de hongos DSE más estudiadas. En un detallado estudio de la interacción de este hongo con raíces de *Asparagus officinalis*, fueron descritas hifas globosas formando apresorios en la superficie de las células de la rizodermis (Yu y col. 2001). En cambio en otro hospedante, *Rhododendron brachycarpum*, este hongo ingresó mediante hifas de penetración que aparentemente degradaron la pared celular vegetal enzimáticamente, sin presentar aspecto de apresorio (Currah y col. 1993).

Todas nuestras observaciones, así como las descritas en bibliografía dan cuenta de la heterogeneidad que presenta este grupo de hongos. De hecho se ha establecido que la colonización de los hongos DSE varía entre especies y entre cepas de la misma especie (Mandyam & Jumpponen, 2008) y también se ha postulado que el hospedante podría jugar un importante papel en el control de la morfología de la colonización (Villarreal-Ruiz y col. 2004; Walker y col. 2011).

Sólo tres de las especies de que se incluyeron como endofitos en sentido estricto fueron citadas anteriormente como hongos DSE. *Alternaria alternata* que fue aislado por Cisneros (2011) a partir de raíces de *Triticum aestivum* en donde, en principio, colonizó mediante hifas hialinas, pero posteriormente, 60 días después de la inoculación del hongo, dio origen a las típicas estructuras de los DSE. Este hongo también fue citado como endofito de vástago de *G. max*, de donde fue aislado con alta frecuencia (Larran y col. 2002). *C. sphaerospermum* también fue citado como endofito y, al igual que en este trabajo, fue aislado de raíces de *G. max* (Hamayun y col. 2009). Estos autores realizaron una caracterización de la cepa y encontraron que fue capaz de producir giberelinas, las que serían responsables de la promoción del crecimiento en su hospedante natural. Finalmente *Humicola fuscoatra* fue aislado en un trabajo que estudió la diversidad de hongos endofitos de raíz en *Oryza sativa* (Naik y col. 2009), sin profundizar en la caracterización del aislamiento. Del resto de los endofitos encontrados en este trabajo y que se incluyeron en la categoría 1, ninguno fue citado como endofito asintomático de raíz, pero sí fueron encontrados en otros hábitats. Así por ejemplo, *Paraphoma radicina* fue aislado tanto a partir de agua dulce como de árboles de *Prunus pérsica* en Australia donde se lo describió como patógeno (El-Elimat y col. 2014; McAlpine, 1902) y ejemplares de *Coniothyrium cerealis* fueron aislados de suelos

agrícolas y de *Triticum aestivum* tal como se menciona en la base de datos MycoBank (www.mycobank.org). Este trabajo constituye el primer reporte, que incluye no solamente el aislamiento de estos hongos en nuestro país, sino también, describe el modo de colonización y la respuesta originada en el hospedante de origen, *G. max*.

En contraste con los endofitos en sentido estricto, los patógenos necrotrófos, matan las células para luego utilizar sus componentes como fuente de nutrición. Suelen macerar los tejidos de las plantas a través de la producción de enzimas hidrolíticas que degradan polímeros de la pared celular (Laluk & Mengiste, 2010). Por otra parte, los patógenos biótrofos y hemibiótrofos deben interactuar con las células de plantas vivas, la totalidad o parte de su ciclo de vida, y típicamente emplean estrategias más sutiles para interactuar con la pared celular (Szabo & Bushnell, 2001). En este sentido Hardham y Mitchell (1998) y Harrison (1999) proponen que la formación de papilas constituye una respuesta típica frente a la penetración de las hifas de los hongos patógenos necrotrófos o hemibiótrofos, y la ausencia de dicha respuesta, estaría asociada a la presencia de patógenos biótrofos.

La deposición de papilas en los sitios de detección de patógenos se cree que actúa como una barrera física para limitar el acceso de patógenos al interior de las células (Underwood 2012). Aceptando esta postura, dado que en gran parte de las plantas de los ensayos realizados en este trabajo, se encontraban en buen estado, pero presentaron evidente cantidad de papilas, se puede asumir que estas barreras físicas se originaron para evitar el desarrollo de un potencial patógeno. Los aislamientos que desencadenaron respuestas de defensa en los tejidos de *G. max* fueron incluidos en la categoría 2. En contraste, los aislamientos agrupados en la categoría 3, deterioraron el estado de la planta y no se observaron barreras físicas en las raíces.

Llamativamente, en el caso de las dos especies más representadas, *Paraphoma radicina* y *Alternaria alternata*, los distintos aislamientos no quedaron confinados únicamente a una de las categorías. Por ejemplo, *P. radicina* fue incluido principalmente en las categorías 2 y 3, mostrando una dualidad en su comportamiento, teniendo presente que se trata mismo hospedante y la misma variedad. Además, *P. radicina* presentó un aislamiento que se comportó como endófito en sentido estricto, quizás en este caso estamos en presencia de un aislamiento menos virulento que el resto, o que al momento de la cosecha todavía no había originado síntomas de enfermedad. En el caso

de *A. alternata*, los aislamientos de esta especie formaron parte de los categorías 1, 3 y 4. Aunque la categoría más representativa de esta especie fue la 3, esta especie se caracterizó por no inducir la formación de papilas y ocasionar síntomas de enfermedad en la planta. *Alternaria* es considerado un patógeno leve que causa mancha foliar (Herrera Parra y col. 2011). No hemos encontrados citas de *P. radicina* como patógeno.

Los aislamientos de *P. radicina* y *A. alternata* descritos como endofitos estrictos, presentaron típicamente colonización paralela y perpendicular al eje mayor de la planta. En este último caso, ingresando mediante la formación de apresorios en el interior de la raíz. Este patrón fue presentado también por un conocido patógeno de *G. max* aislado en este trabajo, *Corynespora cassicola* (Wrather y col. 1997). Las formas de colonización que presentaron estos hongos, sumado a que las categorías más representativas fueron la 2 y 3 (“endofitos en sentido amplio” y “patógenos hemibiotrofos”) nos podría estar indicando que son saprobios oportunistas – patógenos hemibiotrofos. Estos presentan ventajas frente a los saprobios, al colonizar los tejidos vegetales antes que se produzca la senescencia, durante su fase biotrófica, para luego hacer la transición a la fase necrotrofica, en la que mata a su hospedante, crece rápidamente y se reproduce, como ocurre en el caso del patógeno *Colletotrichum* (O’Connell y col. 2012).

Cabe destacar que todos los aislamientos pertenecientes al género *Alternaria*, independientemente en la categoría en los que fueron incluidos, presentaron todas las capacidades enzimáticas evaluadas. Incluso uno de los aislamientos de *A. alternata* fue incluido en la categoría 4 (“Patógenos necrotrofos”), por producir pudrición blanda en las plántulas de *G. max*. Este aspecto, constituye otra evidencia que confirma su naturaleza principalmente saprofítica. En la categoría 4 además fue incluido *Macrophomina phaseolina*, agente patógeno causante de podredumbre carbonosa (Wrather y col. 1997), que además también presentó todas las actividades enzimáticas. Su comportamiento en nuestro sistema de resíntesis, dio origen a los síntomas citados en bibliografía.

En cuanto a las enzimas extracelulares, encontramos que únicamente la mitad de los endofitos (categoría 1) presentaron actividades endoglucanasa y polimetilgalacturonasa, mientras que una mayor proporción de éstos presentaron exoglucanasa. En contraposición, los aislamientos de la categoría 4 presentaron todas las actividades enzimáticas. Hasta el momento poco se conoce de las implicancias de estas propiedades

en la simbiosis con los DSE; es decir, cuál es el grado de saprofitismo y biotrofismo que estos hongos poseen y si esta dualidad varía en función de las condiciones ambientales, las interacciones con el hospedante o de la especie de hongo DSE en cuestión. En ciertas cepas de *Phialophora finlandia* y *Phialocephala fortinii* se reportaron actividades enzimáticas que incluyen amilasas, celulasas, laminarinasas, pectinasas, proteasas y xilanasas (Caldwell et al. 2000). En el trabajo realizado por Mandyam (2008) con *Periconia* y *Microdochium* fueron detectadas las actividades amilasa, celulasa, polifenol oxidasa y proteasa. Si bien en este trabajo no se evaluaron todas esas actividades enzimáticas, nuestros resultados no coinciden, ya que los endofitos, exceptuando a los pertenecientes al género *Alternaria*, no presentaron todas las capacidades enzimáticas evaluadas, mientras que los aislamientos que se comportaron claramente como patógenos difieren en su perfil enzimático. En resumen, los endofitos (categoría 1) fueron los que menos capacidades enzimáticas presentaron en contraposición con los patógenos necrótrofos que fueron los que presentaron todas las capacidades enzimáticas, entre los que está incluido el conocido patógeno *Macrophomina phaseolina*. Estos resultados indican que podría existir una relación entre sus capacidades enzimáticas y el tipo de interacción con su hospedante.

Barrow y Osuna (2002) informaron que una cepa de *Aspergillus ustus*, considerada como un hongo DSE y que mostró una asociación de tipo mutualística con *Atriplex canescens*, logró hidrolizar fuentes de fósforo (P) no disponible para la planta como fosfato de tricalcio, incrementando la biomasa de vástago y raíz. Como consecuencia de ello, sugirieron que este hongo mejoraba a través de esta capacidad, la nutrición de la planta hospedante. Este es el único trabajo en el que un hongo DSE fue descrito como solubilizador de formas inorgánicas de P, aspecto que coincide con los resultados de este trabajo, en el que ningún aislamiento mostró esta capacidad.

La producción de AIA no estuvo limitada a ninguna de las categorías, ni a los géneros. Particularmente, *Cladosporium sphaerospermum* ha sido citado como promotor del crecimiento de *G. max* (Hamayun y col. 2009), aunque los autores le atribuyen ese comportamiento a la producción de giberelinas, en este trabajo encontramos que también es capaz de producir AIA. Estas propiedades junto con el hecho que fue aislado en varios trabajos como endofito, incluso de plantas de *G. max*, y de acuerdo a nuestros

resultados que indican que el aislamiento perteneciente a esta especie pertenece a la categoría 1, lo postula como un posible mutualista de *G. max*.

CAPÍTULO III

FUENTES DE NITRÓGENO: UTILIZACIÓN, FACILITACIÓN Y
TRANSLOCACIÓN.

INTRODUCCIÓN

La ubicuidad y amplio rango de hospedantes de los hongos DSE, ha llevado a sugerir que éstos podrían ser similares a los hongos MA en cuanto a sus funciones en los ecosistemas y la interacción con la planta (Mandyam y Jumpponen 2005; Newsham y col. 2009). Sin embargo, diversos estudios mostraron resultados contradictorios, incluyendo desde efectos positivos a negativos, inclusive la falta de efectos sobre su hospedante (Jumpponen 2001; Newsham y col. 2009).

Quienes apoyan la hipótesis de que los hongos DSE originan una simbiosis de tipo mutualística, sostienen que, mientras la planta muestra una mayor eficiencia en la captación de nutrientes y en su crecimiento, el hongo se beneficia con la incorporación de fotosintatos (Jumpponen 2001). Evidencias que sostienen esta postura, incluyen los resultados de Barrow y Aaltonen (2001) quienes observaron raíces de *Atriplex canescens* y determinaron que, en plantas fisiológicamente activas, el micelio presentaba cuerpos lipídicos, en contraposición con la baja proporción de los mismos en tejidos inactivos. Concluyeron que estos cuerpos lipídicos, estaban presentes como consecuencia de la incorporación de fuentes de C provenientes de la planta hospedante.

Sólo en un trabajo se ha comprobado el intercambio en forma directa; en él, Usuki y Narisawa (2007) demostraron que el hongo *Heteroconium chaetospora* es capaz de incorporar fuentes C a partir de *Brassica campestris*, una planta típicamente no micorrícica, la que accede a algunas de las fuentes nitrogenadas que le fueron suministradas, solamente cuando se encontraba colonizada por el hongo DSE. Además cuando *H. chaetospora* colonizó las raíces de las plantas en condiciones con bajo contenido de glucosa en el medio salino basal de crecimiento, el ergosterol aumentó significativamente en contraposición a lo observado cuando el hongo creció sin el hospedante. Todas estas observaciones llevaron a afirmar que este hongo puede formar una asociación mutualista con *Brassica campestris*. █

El papel de los hongos DSE en el metabolismo del Nitrógeno, y por ende en la nutrición de su planta hospedante también fue puesto en evidencia por Newsham y col.(2009). En su

trabajo demostraron que la mayoría de los DSE aislados de *Deschampsia antarctica* incrementaron la biomasa en presencia de una fuente orgánica como única fuente de Nitrógeno, por lo que sugirieron que los DSE serían capaces de mineralizar péptidos y aminoácidos en la rizósfera, dando origen a formas nitrogenadas accesible para las plantas.

La rizsfera es un ambiente ricamente poblado por diversos microorganismos que subsisten con compuestos liberados por las raíces de las plantas. Éstos a su vez, pueden mejorar la absorción de nutrientes por las raíces de la planta y favorecer el acceso a otros cuando se encuentran en formas no disponibles (Lugtenberg y Kamilova 2009). Mientras que las plantas y los microbios aparentemente prefieren tomar el Nitrógeno en sus formas inorgánicas, su capacidad para tomar y utilizar aminoácidos puede conferir una ventaja selectiva en ciertos entornos donde formas orgánicas de Nitrógeno son abundantes (Moe 2013).

Por otra parte se ha propuesto que, los resultados de las interacciones entre los organismos estrechamente asociados pueden depender de las condiciones ambientales (Bronstein, 1994). Esto significa que una relación mutualística puede convertirse parasítica, si los mismos recursos de los que depende la asociación son muy limitados o inclusive se encuentran disponibles en exceso (Graham y Eissenstat 1994; Johnson 1993; Jones y Smith 2004). En un estudio realizado en *Persea americana* con una micorriza, *Glomus intrarradices*, y un endofito, *Chaetomium elatum*, empleando distintas proporciones de inóculo y dos condiciones de iluminación, Violi y col. (2007) concluyeron que el endofito se comporta como comensalista en condiciones de alta intensidad lumínica pero se convierte en patógeno leve cuando los recursos son limitantes y la competencia interespecífica es alta.

En este capítulo se estudia la capacidad para utilizar fuentes nitrogenadas de una selección de hongos DSE y sus efectos sobre el crecimiento de *Glycine max*.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Los hongos DSE son capaces de utilizar el Nitrógeno a partir de fuentes orgánicas.
- Los hongos DSE favorecen la incorporación de nutrientes en *Glycine max*, como consecuencia de la mineralización de formas orgánicas de Nitrógeno a las que la planta no puede acceder, mejorando consecuentemente su estado nutricional.

OBJETIVOS PARCIALES

- Evaluar la capacidad para emplear distintas fuentes de Nitrógeno, tanto por parte de los hongos DSE, como de *G. max*. A partir de estos resultados seleccionar endofitos que permitan estudiar su efecto en el hospedante y establecer su potencial como microorganismos beneficiosos de la nutrición vegetal.
- Realizar co-cultivos de *G. max* con los endofitos y las fuentes nitrogenadas seleccionadas para determinar si la interacción mejora la nutrición de la planta, es decir si el endofito facilita el aprovechamiento de dichas fuentes.
- Establecer si tanto el aprovechamiento de la fuente nitrogenada como el comportamiento del endofito es modificado en diferentes condiciones de disponibilidad de fuentes carbonadas, mediante el agregado de Glucosa al medio de cultivo.
- Determinar si existe translocación de Nitrógeno en el o los casos positivos de facilitación.
- Complementar el análisis de la interacción en las condiciones antes mencionadas, con el estudio a nivel anatómico del grado y tipo de colonización por el endófito y la respuesta de los tejidos de la raíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

UTILIZACIÓN DE FUENTES ORGÁNICAS E INORGÁNICAS DE NITRÓGENO

UTILIZACIÓN DE FUENTES NITROGENADAS POR LOS ENDOFITOS

Cinco hongos endofitos: *Coniothyrium cereals* (BA XIII 1-1), *Humicola fuscoatra* (CA IV 1-1), *Paraphoma radicina* (CA XIV 4-2), *Cladosporium sphaerospermum* (CA 16 5-4) y el Morfotipo 1, CA I 1-3 fueron cultivados en medio líquido con cinco fuentes de Nitrógeno diferentes. Se emplearon tres fuentes orgánicas (Glicina, Glutamina y Valina) y dos inorgánicas (NaNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), con y sin agregado de Glucosa 1% (pH final= 5.0) como fuente principal de Carbono (Usuki & Narisawa, 2007). Las fuentes de Nitrógeno fueron agregadas al medio Melin Norkrans (MMN) en una concentración de 100 mg NL^{-1} de manera que la relación C:N quedó en 40:1 y 10:1, con y sin agregado de glucosa 1% respectivamente. Cada aminoácido fue esterilizado por filtración (filtro MILLIPORE®) y luego agregado al medio ya autoclavado. Las fuentes inorgánicas fueron agregadas al medio MMN antes de autoclavar. En el control se omitió el agregado de la fuente nitrogenada. Cada uno de los cinco hongos fue inoculado como trozos de agar de 0,5 cm de diámetro en 30 ml de medio contenido en cajas de Petri de 9 cm. Se procedió a su incubación en condiciones estáticas a 25°C durante 40 días. Se realizaron cuatro réplicas en cada medio empleado. Como medida del crecimiento y eficiencia en la utilización de las fuentes de Nitrógeno con y sin fuente de C agregada, se determinó la biomasa fúngica producida, a través de la determinación del peso seco del micelio (en estufa a 80°C). Para establecer las fuentes empleadas más eficientemente en cada condición y por cada hongo, los resultados obtenidos se analizaron con el Análisis multivariado de la varianza (MANOVA) y se realizó un Análisis discriminante.

UTILIZACIÓN DE FUENTES NITROGENADAS POR *GLYCINE MAX*

Para el ensayo de uso de las fuentes nitrogenadas por *G. max*, se usó el Medio Basal (MB) sólido (Usuki y Narisawa, 2007). Se emplearon tres fuentes orgánicas (Glicina,

Glutamina y Valina) y dos inorgánicas (NaNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Cada aminoácido fue esterilizado por filtración (filtro MILLIPORE®) y agregado al medio autoclavado. Las fuentes inorgánicas fueron agregadas al medio MB antes de autoclavar. En el control se omitió el agregado de la fuente nitrogenada. Cada una de las fuentes de Nitrógeno fue agregada en una concentración de 100 mg NL^{-1} . Las semillas fueron esterilizadas superficialmente en una solución de NaOCl 10% por 15 min, eliminando ésta a través de tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri con medio Agar Agua e incubadas a 25°C en oscuridad hasta que la radícula emergió. Posteriormente fueron transferidas a cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad a 25°C y 60% de humedad, hasta que sus cotiledones se encontraron completamente verdes.

Para el crecimiento de las plantas se emplearon frascos de cultivo de policarbonato (77 x 77 x 160 mm) conteniendo 40 ml de medio agarizado, al que fueron transferidas las plántulas. Éstas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 25°C , bajo un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 hs y 60% de humedad. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento. Después de 30 días las plantas se cosecharon, y se estimó la biomasa producida, a través de la determinación del peso seco del vástago. Los resultados obtenidos se analizaron mediante Análisis univariado de la varianza.

FACILITACIÓN DE FUENTES ORGÁNICAS DE NITRÓGENO EN DIFERENTES RELACIONES C:N

Para el ensayo de facilitación fueron seleccionados dos hongos endofitos y dos fuentes de Nitrógeno. Los endofitos fueron seleccionados por su capacidad de utilización de las fuentes que *G. max* no fue capaz de utilizar. Se prefirió el par que mostró comportamiento diferencial en cuanto a la fuente empleada, uno utilizó más eficientemente Valina y el otro Glycina.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudió el efecto de los endofitos seleccionados sobre el crecimiento de *G. max* incorporando las dos fuentes orgánicas de Nitrógeno mencionadas y en dos relaciones C:N,

mediante la incorporación de Glc. Por lo tanto se contó con tres factores en un diseño factorial completamente aleatorizado. El factor “endofito” con tres niveles, *Cladosporium sphaerospermum* (E1), *Coniothyrium cerealis* (E2) y sin endofito (E-), el factor “fuente de Nitrógeno” con tres niveles, Valina (Val), Glycina (Gly) y sin fuente de Nitrógeno (N-) y el factor “relación Carbono:Nitrógeno” con dos niveles, uno con Carbono limitante (10:1) y otro con Carbono en exceso (40:1). Se realizaron 4 réplicas por tratamiento, en el tabla III-1 se pueden observar todos los tratamientos. Las variables respuesta determinadas fueron: área foliar, longitud de vástago, longitud de raíz, peso seco de vástago (PSV) y peso seco de raíz (PSR).

Tabla III-1. Tratamientos del ensayo en cámara de crecimiento con *G. max*, en distintas condiciones de fuente de C (Relación C:N) y con dos fuentes orgánicas de N; N-, control sin agregado de aminoácidos; Val, agregado de Valina; Gly, agregado de Glycina. E-, sin endofito; E1, *Cladosporium sphaerospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*.

| | Relación C:N 10:1 | | | Relación C:N 40:1 | | |
|-----------|-------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|
| | N- | Val | Gly | N- | Val | Gly |
| E- | E- N- 10:1 | E- Val 10:1 | E- Gly 10:1 | E- N- 40:1 | E- Val 40:1 | E- Gly 40:1 |
| E1 | E1 N- 10:1 | E1 Val 10:1 | E1 Gly 10:1 | E1 N- 40:1 | E1 Val 40:1 | E1 Gly 40:1 |
| E2 | E2 N- 10:1 | E2 Val 10:1 | E2 Gly 10:1 | E2 N- 40:1 | E2 Val 40:1 | E2 Gly 40:1 |

CULTIVO IN VITRO

Para el co-cultivo de *G. max* y los endofitos se usó un medio basal sólido (Usuki y Narisawa, 2007). Las dos fuentes orgánicas de Nitrógeno fueron agregadas en una concentración de 100 mg NL⁻¹. Se agregó glucosa, en masa variable dependiendo de la fuente de nitrógeno, para ajustar una proporción final de C:N de 10:1 y 40:1. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente y puestas a geminar como se explicó en utilización de N por *G. max*. Una vez que presentaron los cotiledones verdes y la radícula superó 1 cm de longitud, fueron sometidas a la inoculación.

INOCULACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE *G. MAX* CON LOS ENDOFITOS

El modo de inoculación utilizado consistió en colocar la plántula de *G. max* sobre las colonias de los endofitos a evaluar, crecidas en AEM, durante 7 días, en cajas de Petri de 5 cm de diámetro. Las plántulas se dispusieron de modo tal que existiera un íntimo contacto

entre la raíz y el hongo y se colocaron por 48 hs en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a 25°C y 60% de humedad. Se realizaron los controles sin el hongo.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Para el crecimiento de las plantas se emplearon frascos de cultivo de policarbonato (77 x 77 x 160 mm) conteniendo 40 ml de medio agarizado al que fueron transferidas las plántulas, ya inoculadas. Los controles no se inocularon con los endofitos.

Las plántulas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 25°C, bajo un ciclo de luz:oscuridad de 16:8 hs y 60% de humedad. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento. Después de 30 días las plantas fueron cosechadas. Las variables respuesta determinadas fueron: área foliar, longitud de vástago, longitud de raíz, peso seco de vástago (PSV) y peso seco de raíz (PSR).

TRANSFERENCIA DE NITRÓGENO

CULTIVO IN VITRO

Este ensayo fue realizado únicamente con la cepa de hongos DSE que en el ensayo de facilitación, mostró mayor promoción del crecimiento. Este fue el caso de *Cladosporium sphaerospermum* (E1). Para determinar la capacidad de transferencia de Nitrógeno desde el hongo endofito al hospedante, los frascos de cultivo fueron divididos horizontalmente en dos compartimentos separados por una membrana con aberturas de 20 μ m, la que permite el paso de las hifas únicamente (Figura III-1). Esta membrana fue sostenida con una placa de policarbonato con perforaciones. El compartimento superior contenía 30 ml de medio basal sin fuente de Nitrógeno, mientras que el inferior se completó con 30 ml de medio con Valina, la fuente mejor empleada por esta cepa. Las plántulas ya inoculadas, se colocaron en el compartimento superior. De este modo, en el compartimento superior coexistieron el hongo endofito y la planta, mientras que el inferior fue colonizado únicamente por el hongo. Los controles no fueron inoculados con el endofito. Después de 30 días, las plantas se cosecharon, y se determinó: área foliar, longitud de vástago, longitud de raíz, peso seco

de vástago (PSV) y peso seco de raíz (PSR). Parte de la raíz fue teñida con Azul de Tripán y se determinó la presencia de los endofitos.



Figura III-1. Dispositivo utilizado para el ensayo de translocación de Nitrógeno. Los compartimentos superior (CS) e inferior (CI), se encuentran separados por una maya (M) que impide el paso de la raíz, y un soporte (S) de polipropileno.

ESTUDIOS ANATÓMICOS

Para realizar cortes transversales de la raíz de *G. max* inoculada y sin inocular con *Cladosporium sphaerospermum* CA16 5-4, se utilizó un criostato (Reichert). Las raíces frescas fueron cortadas en fragmentos de 0,5 cm y se inmovilizaron en el soporte del criostato con el medio de montaje (Histomount). Los cortes fueron recogidos en porta objetos, y luego de 24 hr se procedió a la tinción con una gota de azul de algodón. Los cortes fueron observados en el microscopio óptico.

La composición de los medios utilizados se encuentra detallada en el Anexo.

RESULTADOS

UTILIZACIÓN DE FUENTES ORGÁNICAS E INORGÁNICAS DE NITRÓGENO

El MANOVA realizado reveló que existen diferencias significativas en el crecimiento de los endofitos dependiendo de la fuente nitrogenada proporcionada. El análisis discriminante produjo dos funciones discriminantes (Tabla III-4). El eje canónico 1 (79% de la varianza explicada) se refleja en la utilización de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Gly y Val en presencia de glucosa, donde *Coniothyrium cerealis* se diferenció del resto de los endofitos, junto con este endofito se ubican todos los endofitos en ausencia de glucosa (Figura III-2). El eje canónico 2 (14% de la varianza explicada) separa los endofitos restantes y refleja principalmente la utilización de las fuentes orgánicas de Nitrógeno (Val, Gly y Gln) en presencia de glucosa.

Tabla III-4. Funciones discriminantes del análisis multivariado, de utilización de fuentes nitrogenadas, para cada eje canónico (EC)(datos estandarizados con las varianzas comunes).

| Funciones discriminantes - | | |
|----------------------------|-------|-------|
| | EC1 | EC2 |
| NO3 | 0,5 | 0,04 |
| NH4 | -0,25 | -0,38 |
| VAL | 0,36 | -0,9 |
| GLY | 0,82 | 0,59 |
| GLN | 0,08 | -0,61 |

En rasgos generales, los endofitos fueron más eficientes en la utilización de las fuentes de Nitrógeno en presencia de glucosa. Los análisis de la varianza univariados posteriores (Figura III-3) indican, al igual que el análisis discriminante, que las diferencias significativas entre los endofitos están dadas principalmente por la en presencia de glucosa. *Coniothyrium cerealis* fue muy poco eficiente en la utilización de las fuentes evaluadas (Figura III-3A), presentando crecimiento únicamente en presencia de glucosa y NaNO_3 .

En cambio el endofito CA I 1-3 (Morfotipo 1), en presencia de glucosa, presentó diferencias significativas en el crecimiento con las fuentes de Nitrógeno: NaNO_3 , Gly, Val y Gln (Figura III-3B). El mismo patrón de crecimiento fue observado en *Humicola fuscoatra* (Figura III-3C) y en *Cladosporium sphaerospermum* (Figura III-3E). *Paraphoma radicina* creció más eficientemente en NaNO_3 , Val y Gly (Figura III-3D). En todos los casos en presencia de Glc.

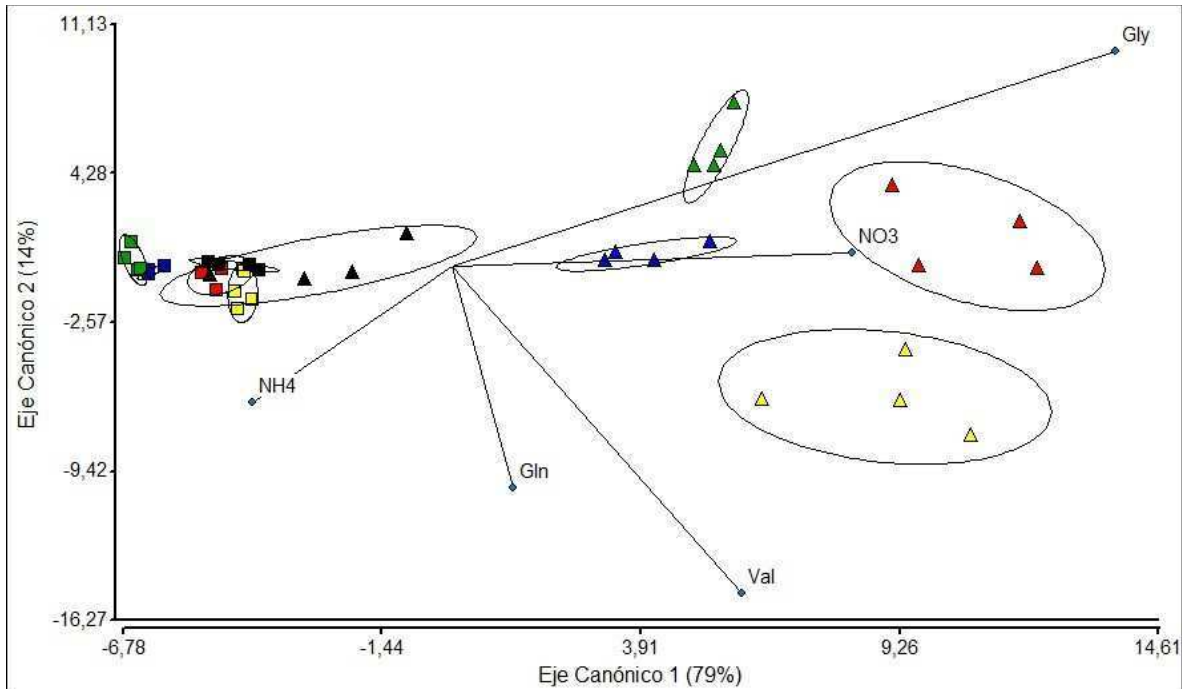


Figura III-2. Primer y segundo ejes canónicos (EC1 y EC2) del análisis discriminante en la utilización de las fuentes de Nitrógeno. Los símbolos: cuadrados (sin glucosa), triángulos (con glucosa), amarillos (*Cladosporium sphaerospermum*), negros (*Coniothyrium cerealis*), rojo (*Paraphoma radicina*), azul (*Humicola fuscoatra*) y verde (morfotipo 1).

En base a estos resultados fueron seleccionados dos endofitos y dos fuentes nitrogenadas. En la elección de la fuente se seleccionaron 2 fuentes orgánicas de Nitrógeno, formas que *G. max* no fue capaz de utilizar, Valina y Glycina. En cuanto a los endofitos se seleccionaron dos con comportamientos opuestos en la utilización de las fuentes orgánicas, uno de ellos, E1 (*Cladosporium sphaerospermum*), fue capaz de utilizar las tres fuentes de nitrógeno orgánico, el otro, E2 (*Coniothyrium cerealis*) no fue capaz de utilizar ninguna de las fuentes de Nitrógeno de origen orgánico. Siendo E1 el que mejor utilizó todas las fuentes orgánicas y E2 el que no creció en ninguna, excepto en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

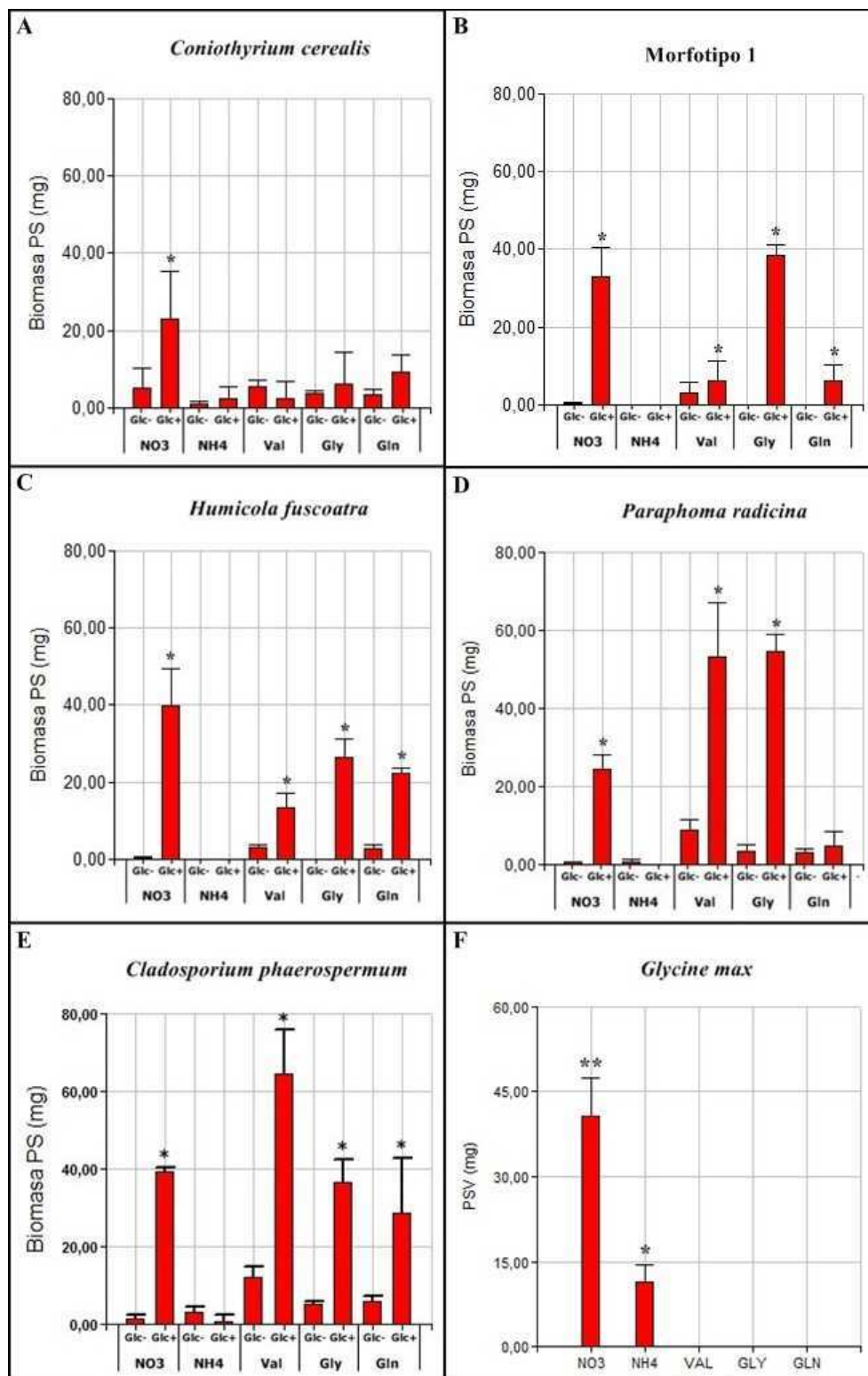


Figura III-3. Utilización de fuentes nitrogenadas (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Val, Gly y Gln) en ausencia y presencia de glucosa 1%. La biomasa fue estimada a través del peso seco del micelio

(mg). En todos los casos fue restado el valor del control sin Nitrógeno. Distinta cantidad de asteriscos representa diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

FACILITACIÓN DE FUENTES ORGÁNICAS DE NITRÓGENO

El MANOVA reveló diferencias significativas en el ensayo de facilitación de las fuentes de Nitrógeno. El análisis discriminante produjo dos funciones discriminantes (Tabla III-5). El eje canónico 1 (62% de la varianza explicada) refleja el peso seco de raíz y longitud de vástago (Figura III-4), lo que separó a la izquierda del gráfico los tratamientos con glucosa 1%, en este caso los rasgos más significativos fueron: mayor peso seco de la raíz y mayor longitud de vástago. El eje canónico 2 (12% de la varianza explicada) refleja principalmente el área foliar y la longitud de raíz (Figura III-4), éste eje resalta que el endofito E1, en presencia de valina y ausencia de glucosa, promueve el desarrollo de la planta, existiendo diferencias significativas en el área foliar, lo que no ocurre en presencia de glucosa (Figura III-5).

Tabla III-5. Funciones discriminantes del análisis multivariado, de facilitación de fuentes nitrogenadas, para cada eje canónico (EC) (datos estandarizados con las varianzas comunes).

| Funciones discriminantes | | |
|--------------------------|-------|-------|
| | EC1 | EC2 |
| Área foliar | -0,06 | 0,54 |
| Long. Vástago | 0,6 | 0,45 |
| N° hojas | -0,22 | 0,19 |
| PSV | -0,19 | -0,36 |
| PSR | 0,2 | 0,21 |
| Long. Raíz | -0,06 | 0,73 |
| N° ramif. Raíz | -0,93 | 0,14 |

En base a los resultados antes mencionados E1 (*Cladosporium sphaerospermum*) fue evaluado en el ensayo de translocación de Nitrógeno, utilizando como fuente de Nitrógeno la Valina.

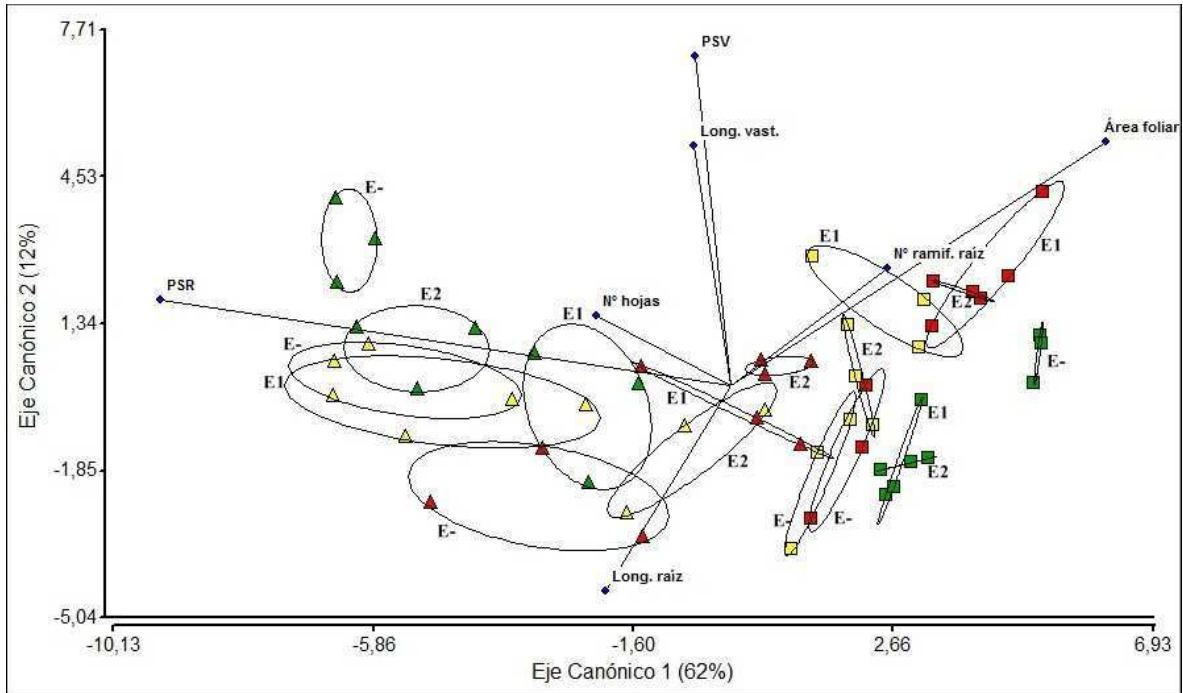


Figura III-4. Representación de los dos primeros ejes del análisis discriminante en la facilitación de las fuentes de N. El Eje Canónico 1 permitió la separación los tratamientos con glucosa (triángulos) y de los tratamientos sin glucosa (cuadrados). Los casos de color rojo corresponden a los tratamientos sin Nitrógeno, los amarillos con Valina y los verdes con Glycina.

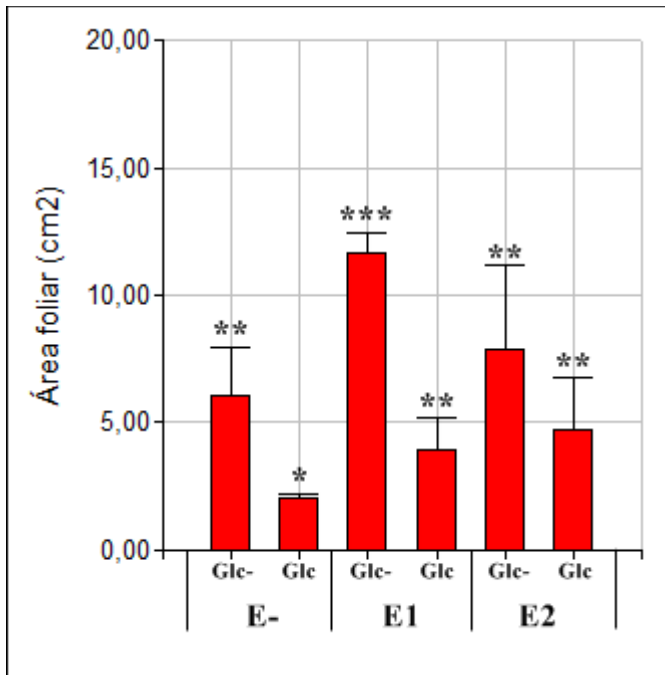


Figura III-5. Área foliar de los tratamientos con Valina como fuente de Nitrógeno. E-, control sin endofito; E1, *Cladosporium phaeospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*. Distinta cantidad de asteriscos representa diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

TRANSLOCACIÓN DE N

En este ensayo, *Cladosporium sphaerospermum* demostró promover el crecimiento de *G. max*, translocando Nitrógeno asimilable para la planta, registrando diferencias significativas en la mayoría de las variables independientes registradas (Longitud de vástago, área foliar, N° hojas trifoliadas, ramificaciones en raíz y peso seco de la raíz). Las mismas se pueden observar en la Figura III-6.

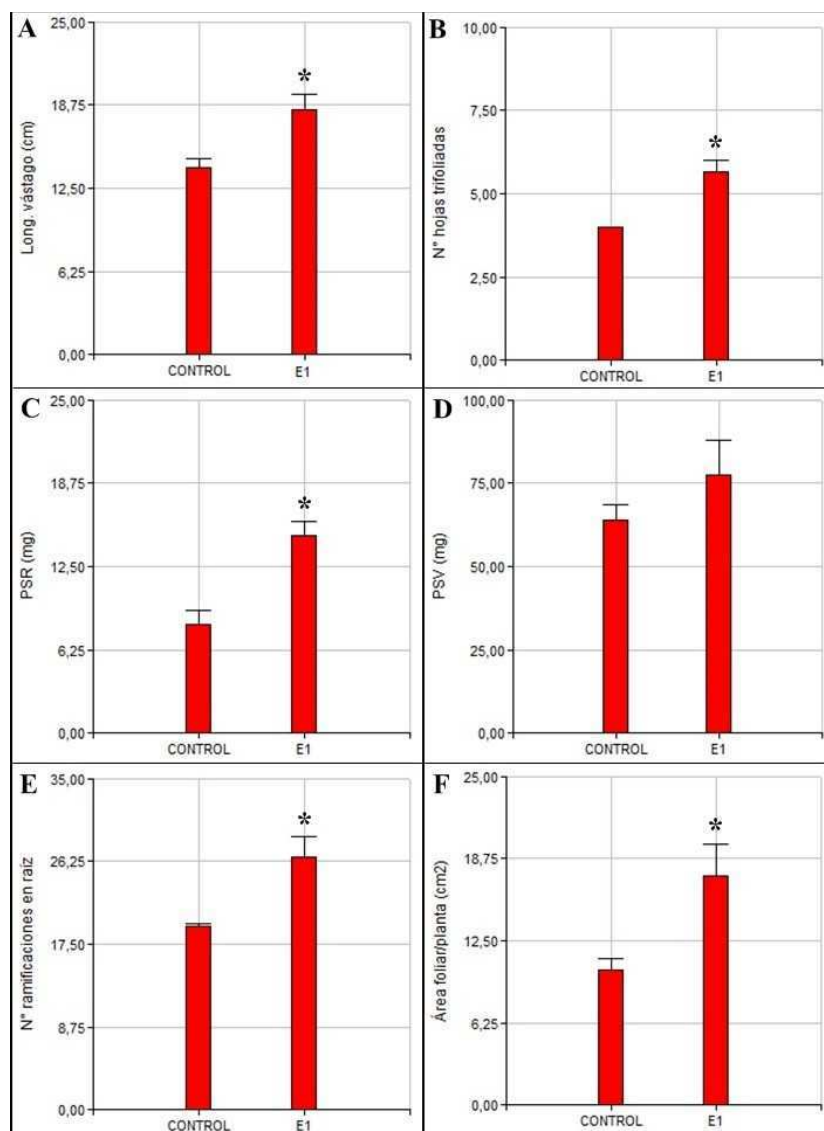


Figura III-6. A-F, Variables de crecimiento de *G. max* evaluadas en el ensayo de translocación, con Valina como fuente de Nitrógeno. E-, control sin endofito: E1, *Cladosporium phaeospermum*. Distinta cantidad de asteriscos representa diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

ESTUDIOS ANATÓMICOS

En los cortes realizados se pudo observar que *Cladosporium sphaerospermum* forma una red de hifas que cubre la superficie de la raíz (Figura III-7C-D). Ingresa por la unión de dos células sin el desarrollo de apresorios. En todos los casos se observó que el hongo coloniza el espacio intercelular de la rizodermis y las capas más externas del la corteza (Figura III-7C). No se encontró colonización del cilindro vascular (Figura III-7B).

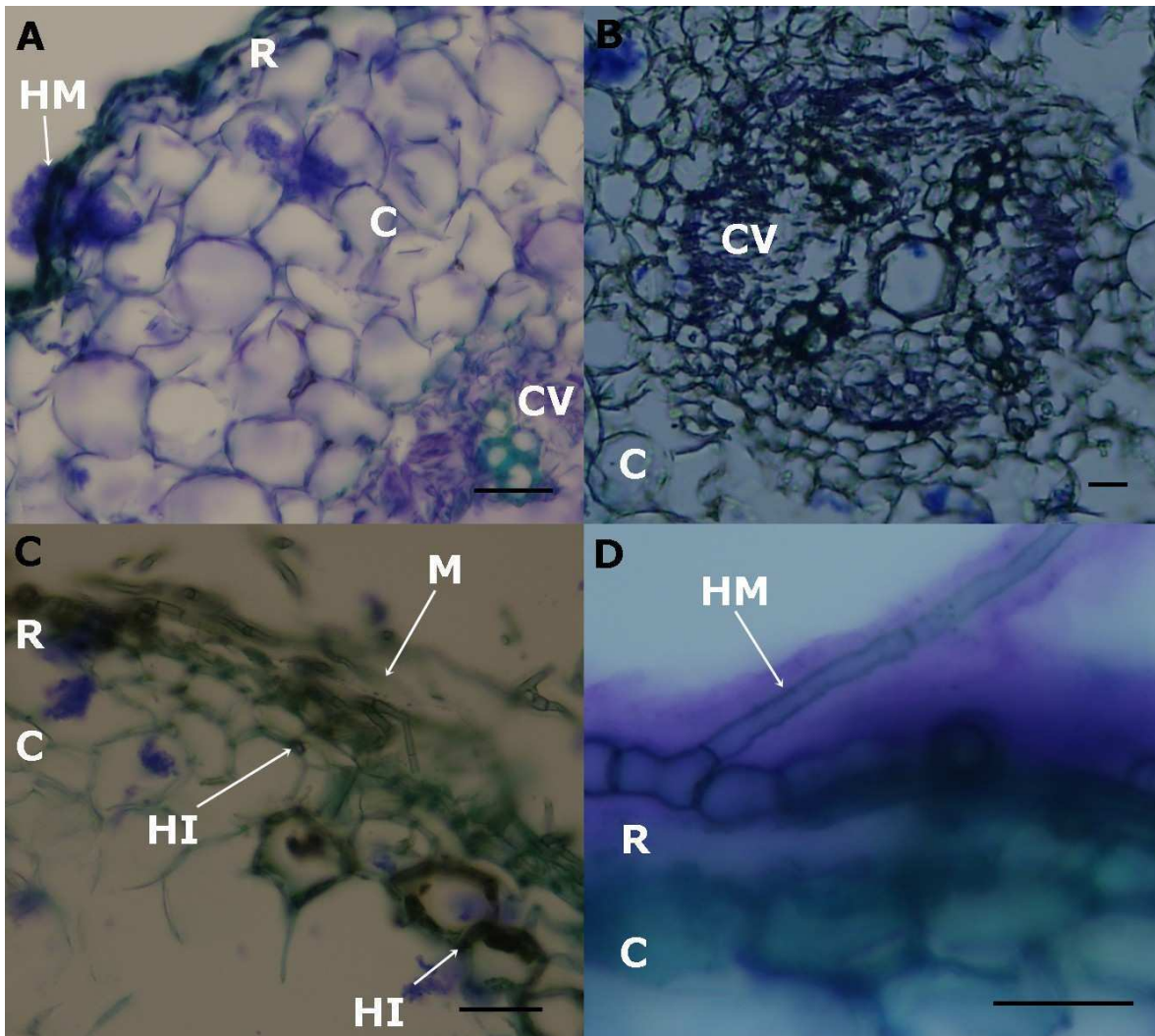


Figura III-7. Cortes transversales de raíz de *G. max* colonizada por *Cladosporium sphaerospermum*, en condiciones del ensayo de translocación. A, presencia de hifas melanizadas (HM) en la rizodermis (R). B, cilindro vascular (CV) en perfecto estado. C, manto formado por el hongo en la superficie de la raíz, hifas intercelulares en rizodermis (R) y corteza (C). D, hifas melanizadas en la superficie de la raíz. La barra corresponde a 20 μm .

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la capacidad de utilización de fuentes simples de N, orgánico e inorgánico, en una selección de hongos DSE provenientes de los dos suelos agrícolas. También se determinó la influencia de dichas capacidades sobre el crecimiento de *Glycine max*, su hospedante natural, al emplear dos de las fuentes orgánicas.

En rasgos generales, 4 de los endofitos fueron capaces de utilizar las fuentes de Nitrógeno suministradas, sólo en presencia de C en exceso (relación C:N 40:1). La única fuente no utilizada fue $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ independientemente de la cantidad de C presente en el medio. En los trabajos realizados hasta el momento, evaluando la capacidad de los DSE en la utilización de fuentes orgánicas e inorgánicas, los resultados son en general, alentadores en relación con el empleo de estos hongos para mejorar la nutrición vegetal y/o promover el crecimiento. Mandyam y col (2010) encontraron que varios aislamientos de *Periconia macrospinosa*, un DSE perteneciente al orden Pleosporales, es capaz de crecer utilizando Ala, Arg, Gly, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NaNO_3 como fuentes únicas de Nitrógeno, cuando la fuente de C se encontraba en exceso. Al igual que *P. macrospinosa*, dos de las especies evaluadas en este trabajo, *Coniothyrium cerealis* y *Paraphoma radicina* pertenecen al mismo orden, sin embargo sólo *P. radicina* utilizó las fuentes de Nitrógeno como *P. macrospinosa*. Usuki y Narisawa (2007) evaluaron el crecimiento de *Heteconium chaetospira* en 7 fuentes de Nitrógeno: NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Gln, Gly, Leu, Phe y Val, tanto en condiciones de C limitante y como en exceso. Encontraron que cuando este hongo crece en condiciones de alta concentración de la fuente de C, es capaz de utilizar todas las fuentes nitrogenadas, mientras que en condiciones de bajas concentraciones, únicamente utiliza las fuentes orgánicas, haciéndolo además en menor medida con respecto a la condición C en exceso. Resultados similares fueron obtenidos en este trabajo con *C. sphaerospermum*, que al igual que *H. chaetospira* pertenece al Orden Capnodiales. Según nuestros resultados y en correspondencia con estos autores, es requerida la presencia de C en exceso para optimizar la utilización de las fuentes orgánicas de Nitrógeno. Por lo que estos hongos podrían ser importantes en la mineralización de N de las fuentes orgánicas simples, presentes en su

hábitat natural, especialmente en asociación con las plantas, las que podrían aportar las fuentes de C necesarias para optimizar el uso de las fuentes simples de N. En este sentido, Usuki y Narisawa (2007), cuantificaron el crecimiento de *H. chaetospira*, en un medio basal con Leu como única fuente de N y determinaron el contenido ergosterol como índice de la biomasa fúngica. Las evaluaciones fueron realizadas en presencia y ausencia de la planta, con una fuente de C en condiciones limitante (C:N 10:1), en exceso (C:N 40:1) y sin fuente de C. Encontraron que la biomasa fúngica aumentó como resultado de la presencia de la planta tanto en las condiciones de C limitante como de C en exceso; sin embargo, los niveles de ergosterol no fueron significativamente diferentes en los sistemas con y sin la planta. Además, si bien en condiciones de C limitante, la planta favoreció el crecimiento del endofito, los autores consideraron que el hongo no accedió a las fuentes de C suministradas por la planta, debido a que encontró fuentes de C externas suficientes y accesibles. Desde el punto de vista de la interacción real entre estos endofitos y la planta hospedante, Usuki y Narisawa (2007) han propuesto que mientras la planta aporta el C necesario para permitir que los endofitos metabolicen el N presente en fuentes orgánicas (los aminoácidos), la planta podría beneficiarse con la mineralización de dichas fuentes, debido a que de lo contrario, no sería capaz de utilizarlas.

En los resultados de facilitación, el análisis multivariado registró diferencias significativas entre los tratamientos realizados. Como se puede observar en el análisis discriminante, la biomasa de las plantas estuvo afectada por las formas de Nitrógeno suministradas, por la presencia de los DSE, en ciertos casos, y por la disponibilidad de C en el medio.

Particularmente, en el caso de *Cladosporium sphaerospermum* se observaron claras diferencias en presencia de Valina, donde las plantas inoculadas, presentaron diferencias significativas en el peso seco, longitud del vástago y área foliar. Estos resultados también fueron encontrados al emplear plantas de *Chinese cabbage* inoculadas con el endofito *Heteroconium chaetospira* (Usuki y Narisawa 2007). En efecto esta planta utilizó cuatro aminoácidos únicamente en presencia del endofito y en esos casos se observaron diferencias significativas en el peso seco. Estos resultados son similares a los descritos en

el trabajo realizado por Jumpponen y col. (1998) en el que evaluaron la respuesta de *Phialophora fortinii* en *Pinus contorta*. Estos autores encontraron que la inoculación con el hongo DSE incrementa significativamente la biomasa de las plantas únicamente en presencia de urea y sugirieron que el hongo utilizó esa fuente y posteriormente transfirió el N al hospedante.

En todos los tratamientos con C en exceso (40:1), la inoculación de la planta resultó neutra a levemente negativa. En presencia de Glycina la respuesta fue neutra a negativa frente a la inoculación con los dos endofitos evaluados. Estos resultados podrían ser atribuidos a la capacidad diferencial que tienen los hongos para utilizar esta fuente de Nitrógeno, coincidiendo con los resultados de utilización, donde *C. sphaerospermum* utilizó más eficientemente valina y *Coniothyrium cerealis* no logró crecer en estas fuentes orgánicas de Nitrógeno. De este modo, podría existir una relación directa entre la capacidad de los endofitos para utilizar fuentes de Nitrógeno orgánico, y la promoción del crecimiento de su hospedante. Para poder establecer si existe dicha relación, sería necesario evaluar más fuentes orgánicas, principalmente las que se encuentran naturalmente en la rizósfera.

Muchos hongos DSE han inducido respuestas variables en diferentes trabajos de inoculación (Jumpponen, 2001). Estas respuestas se han atribuido a la especie del hospedante, la especie del endofito y las condiciones experimentales (Kageyama y col. 2008). Además en trabajos recientes se ha podido establecer que los genotipos de la planta hospedante y del hongo DSE jugarían un papel de importancia (Mandyam y col. 2013). Efectivamente Mandyam y col. (2013) en sus estudios realizados empleando distintos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* y diferentes cepas de *Periconia macrospinoso* y *Microdochium* sp. encontraron que algunos ecotipos, incluido el ecotipo Col-0 respondieron en general negativamente, mientras que otros no mostraron una respuesta característica evidente. Efectos positivos también fueron observados y establecieron que la respuesta es controlada por la variabilidad en los genotipos del hospedante y que puede verse influenciada también por el genotipo de la cepa de hongo DSE.

En este trabajo se observó que las interacciones fueron variables, encontrándose efectos positivos, neutros y negativos. Los dos endofitos, presentaron diversas respuestas

dependiendo de la fuente de N y la disponibilidad de C en el medio. Este tipo de cambio en los resultados ejercidos por el endofito fue observado también en el trabajo realizado por Violi y col (2007), donde *Chaetomium elatum* se comporta como comensal en condiciones de alta intensidad lumínica pero se convierte en patógeno leve cuando los recursos son limitantes y la competencia interespecífica con *Glomus intrarradices* es alta.

Al tratar de confirmar si existe translocación de N, los resultados encontrados fueron contundentes, corroborando las conjeturas a las que los resultados del ensayo de facilitación, nos hicieron llegar. En este ensayo estudiamos el transporte en un sistema compartimentalizado, donde *C. phaerospermum* fue el único capaz de ingresar al compartimento inferior, provisto con la fuente de Nitrógeno orgánico (Val). En presencia del hongo, las plantas de *G. max* presentaron diferencias significativas en varios parámetros de crecimiento. Estos resultados coinciden nuevamente con el trabajo realizado por Usuki y Narisawa (2007), donde *Heteroconium chaetospira* promueve el crecimiento *Chinese cabbage* en un sistema similar al utilizado en este estudio con Leu como fuente de Nitrógeno. Estos experimentos forman parte del conjunto de evidencias que indican que estos hongos podrían mineralizar y translocar el N desde el sustrato de crecimiento, aumentando así, el volumen de explorado por la planta. Sería necesario realizar experimentos adicionales que permitan establecer el mecanismo involucrado.

En este capítulo se logró demostrar que el endofito *C. phaerospermum* es capaz de promover el crecimiento de *G. max*, presumiblemente a través del mejoramiento del estado nutricional, particularmente en condiciones donde el C es limitante.

En ausencia de interfaces especializadas para la transferencia de nutrientes entre los DSE y sus hospedantes (Peterson y col. 2008), se han propuesto varias teorías para explicar el mecanismo por el cual los DSE promueven el crecimiento vegetal. Entre ellas, mayor protección contra los patógenos, síntesis de fitohormonas o la mineralización de compuestos orgánicos presentes en la rizósfera (Addy y col. 2005; Mandyam y Jumpponen 2005; Newsham 1999). En un estudio realizado por Newsham (2000), este autor realizó un meta-análisis, recopilando la información de 18 artículos en los que se realizaron experimentos con hongos DSE. Los análisis categóricos reportados en este trabajo apoyan

la idea de que estos hongos pueden mejorar el crecimiento de las plantas por mineralización de los compuestos de N orgánico, tales como proteínas, péptidos y aminoácidos presentes en la rizósfera, liberando N inorgánico afuera de las raíces, el que queda libremente disponible para las raíces. Por el contrario, cuando se emplearon fuentes de N inorgánico, estos análisis no mostraron efectos positivos en presencia de los endofitoa. Los resultados presentados en esta tesis constituyen una clara evidencia de que los DSE estarían involucrados en la nutrición de la planta hospedante.

Es necesario realizar más trabajos para determinar los efectos a largo plazo de estos hongos en el rendimiento de la planta. Además, los estudios deben centrarse en si los DSE ejercen efectos positivos sobre el rendimiento de la planta en su medio natural.

CAPÍTULO IV

LOS ENDOFITOS SEPTADOS OSCUROS Y SU USO POTENCIAL
COMO BIOINOCULANTES

INTRODUCCIÓN

Históricamente, en Argentina, la actividad agropecuaria ha sustentado el crecimiento económico. Sin embargo, ha sufrido importantes transformaciones a lo largo del tiempo. La producción agrícola masiva se inició a mediados del siglo XIX como consecuencia de la industrialización y el proceso de crecimiento demográfico que se produjo en los países europeos que creó la necesidad de incorporar nuevas áreas productoras de alimentos y materias primas (Magrín y col. 2003). En este contexto económico mundial, el área pampeana de la Argentina se vio favorecida y desde entonces se ha constituido en uno de los pilares fundamentales de la economía argentina. Entre los principales cultivos se destacan los cereales y las oleaginosas y Buenos Aires es una de las provincias con mayor producción. Actualmente el cultivo de *Glycine max* ha desplazado de su área a cultivos históricos como el maíz y el trigo, seguido por un proceso de intensificación de los sistemas agrícolas, basados en la inclusión de cultivos secuenciales de trigo y soja, obteniéndose así un mayor aprovechamiento de recursos y generando cosechas con alto rendimiento y excedentes exportables muy significativos (Caviglia y Andrade 2010). En este momento Argentina es el tercer exportador mundial de soja y el sexto de trigo (De Emilio, 2015).

Como consecuencia de la alta producción, ha surgido la preocupación por el restablecimiento de la fertilidad del suelo, a través de medidas sencillas y de bajo costo. Una de las normas ampliamente implementadas en todo el mundo para lograr el aumento de la producción fue el aumento significativo en el empleo de fertilizantes (Prud'homme, 2005). Sin embargo, en las últimas décadas, frente al agotamiento de recursos naturales del suelo surgió una nueva corriente que sostiene la necesidad de incluir sistemas de producción más sustentables, con menor impacto sobre el agroecosistema. Entre las propuestas sugeridas, se planteó la necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos. La sustentabilidad de los sistemas agrícolas comprende la preservación y/o mejora de la capacidad productiva del sistema desde el punto de vista agronómico, económico y ambiental y de la calidad de los recursos renovables y no renovables involucrados (FAO, 1999). Tomando ventaja de los

procesos naturales, tales como la simbiosis entre plantas y diversos microorganismos, se ha iniciado el desarrollo de un área de investigación con el fin de lograr estos objetivos.

Aunque las simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos asociados a las raíces, se conocen hace más de un siglo (Krings y col. 2007; Peterson y col. 2008; Santi y col. 2013) las asociaciones mutualísticas entre hongos no han sido ampliamente estudiados o utilizados en la agricultura.

Los hongos endofitos septados oscuros (DSE), con su potencial para promover el crecimiento de plantas sin requerir el uso de estos fertilizantes, pueden incrementar la sustentabilidad del sistema de producción agrícola intensiva moderna, mediante la reducción de la dependencia de los fertilizantes sintéticos. Esta asociación representa una nueva área de investigación basada en los beneficios de las interacciones mutualistas entre plantas y hongos no patógenos.

Los hongos DSE están caracterizados por el diámetro pequeño de las hifas, lo que les brinda la posibilidad de alcanzar aquellos sustratos presentes en los microporos del suelo al que no acceden las raíces. Se sostiene que mientras la planta muestra una mayor eficiencia en la captación de nutrientes y en su crecimiento, el hongo se beneficia con la incorporación de fotosintatos (Jumpponen 2001). Muchos estudios han mostrado efectos positivos de algunas de estas cepas como son la promoción del crecimiento, incrementos en pesos secos y contenido de P y de N (Newsham 1999; Jumpponen y col. 1998; Barrow y Aaltonen 2001). El mecanismo y la eficiencia del efecto de promoción del crecimiento dependen en gran medida de las especies de endofitos, así como del hospedante y de las condiciones del medio ambiente.

Entre los trabajos que estudiaron en mayor profundidad esta asociación, se encuentra un estudio relativamente reciente de Usuki y Narisawa (2007). En él demuestran que existe un intercambio de fuentes carbonadas y nitrogenadas entre el hongo *Heteroconium chaetospora* y *Brassica campestris*, una planta típicamente no micorrícica y que no es capaz de utilizar algunos capacidad de utilizar todas las formas de nitrógeno suministradas. Además cuando *H. chaetospora* coloniza las raíces de las plantas en condiciones de bajo contenido de

glucosa, el ergosterol, como medida de la biomasa fúngica, aumenta significativamente; a diferencia de cuando el hongo crece sin un hospedante, indicando que la planta estaría suministrando el Carbono que el hongo necesita.

En algunos hospedantes, *Phialophora fortinii* es capaz de producir sideróforos por lo que también se ha postulado un potencial papel en la nutrición del hierro y en el biocontrol de enfermedades (Bartholdy y col. 2001). El hongo endofito de raíz *Cladorrhinum foecundissimum* mejora de la absorción de gran cantidad de fósforo, aumentando la altura de plantas de algodón (Gasoni y De Gurfinkel, 1997).

El grupo de las bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Estas bacterias se emplean como inoculantes. Particularmente la soja mantiene una asociación mutualística con *Bradyrhizobium japonicum* (Baigorri y Pereyra 2000). En cambio el trigo necesita extraer el Nitrógeno del suelo. Los restos vegetales de la soja tienen un alto contenido de nitrógeno, por lo que la mineralización de los compuestos orgánicos presentes en el rastrojo es fundamental para la nutrición de esta planta (Guerrero Garcia, 1998).

A pesar de la existencia de resultados prometedores, es necesario aclarar que debido a que se trata de resultados acotados y que muchas veces se han obtenido en condiciones controladas. Esto hace necesario realizar ensayos adicionales evaluando distintas especies de hongos DSE en distintas especies y variedades de plantas hospedantes, además de realizar aplicaciones en el campo para corroborar la eficacia agrícola de estas simbiosis. Sin embargo, un aspecto sumamente interesante y alentador de este grupo, es que, a diferencia de otros endofitos como los hongos MA, los DSE pueden ser cultivados fácilmente, por lo que su estudio, empleo y posible obtención de formulaciones para el manejo de los sistemas agrícolas son más factibles.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Los endofitos septados oscuros son capaces de promover el crecimiento de *G. max*, particularmente en condiciones donde los nutrientes no se encuentran disponibles para las plantas. De este modo, dan origen a una interacción beneficiosa.
- Los hongos DSE no impiden el establecimiento de la simbiosis *G. max*-bacteria fijadora de Nitrógeno, pudiendo ejercer, inclusive efectos positivos sobre ella.
- Los endofitos septados oscuros son capaces de promover el crecimiento de *Triticuma aestivum*, particularmente en condiciones donde los nutrientes no se encuentran disponibles para las plantas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los efectos de dos endofitos con repuesta diferencial en los ensayos de caracterización preliminares, sobre el crecimiento y otros parámetros nutricionales, en plantas de *G. max*, en dos condiciones: con un sustrato de crecimiento rico y con un sustrato pobre en materia orgánica.
- Establecer el grado de compatibilidad de ambos hongos con un bio-inoculante de uso habitual en el cultivo de soja, a base de un fijador biológico de Nitrógeno.
- Evaluar los efectos de los endofitos seleccionados en *Triticum aestivum*, en dos sustratos de crecimiento, uno rico y otro pobre en materia orgánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYO EN INVERNADERO CON *GLYCINE MAX*

DISEÑO EXPERIMENTAL

Con un diseño factorial y completamente aleatorizado se evaluó el efecto de dos de los endófitos junto con una bacteria fijadora de nitrógeno en distintos sustratos sobre el crecimiento de *G. max*. Los endófitos seleccionados fueron aquellos empleados en los ensayos de facilitación y que mostraron un comportamiento diferencial en la utilización de fuentes orgánicas. El ensayo comprendió tres factores. El factor “endófito” con tres niveles: *Cladosporium sphaerospermum* (E1), *Coniothyrium cerealis* (E2) y sin endófito (E-), el factor “fijador biológico de Nitrógeno” con dos niveles, con bacteria (B+) y sin bacteria (B-), y el factor “sustrato” con dos niveles, sustrato rico (R+) y sustrato pobre (R-).

En la tabla IV-1 se muestra una síntesis de los tratamientos empleados. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento, las plantas se cosecharon a los 60 días, momento en el que se registró el estado fenológico de cada planta y se determinaron las siguientes variables respuesta: área foliar, N° de nódulos, N° de hojas, peso seco de vástago (PSV) y peso seco de raíz (PSR).

Tabla IV-1. Tratamientos resultantes del diseño experimental en el ensayo en invernáculo. R-, sin agregado adicional de rastrojo; R+, con agregado de rastrojo al 5% p/p; B-, sin bacteria, B+, con bacteria; E-, sin endófito; E1, *Cladosporium sphaerospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*.

| | R- | | R+ | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|
| | B- | B+ | B- | B+ |
| E- | E- B- R- | E- B+ R+ | E- B- R+ | E- B+ R+ |
| E1 | E1 B- R- | E1 B+ R+ | E1 B- R+ | E1 B+ R+ |
| E2 | E2 B- R- | E2 B+ R+ | E2 B- R+ | E2 B+ R+ |

Para los tratamientos con endófitos, las plántulas de *G. max* fueron inoculadas como se explicó en el ítem 1b. Una vez inoculadas se procedió al armado de las macetas.

ARMADO DE LAS MACETAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se emplearon macetas de 900 cm³, las que se llenaron con 800 cm³ del sustrato estéril pobre o rico, según el tratamiento. El sustrato pobre consistió en una mezcla de suelo:perlita:vermiculita en una proporción 1:1:1, mientras que el sustrato rico se obtuvo agregando rastrojo de soja molido en una proporción del 5% (p/p) al sustrato pobre. Sobre el sustrato contenido en la maceta, se realizó un pequeño orificio para depositar la plántula ya inoculada o no con cada endófito, según el tratamiento. Para realizar la inoculación con la bacteria fijadora de nitrógeno, para los tratamientos que fue necesario, se sumergió la radícula de cada unidad experimental en una suspensión de *Bradyrhizobium japonicum* (RIZO-FORTE, RIZOBACTER) en una concentración de 5x10⁹ bacterias en 100 ml.

Para evaluar la compatibilidad de los endofitos evaluados con *Bradyrhizobium japonicum* se realizó un enfrentamiento en medio LB, en donde se sembraron las bacterias en toda la caja con la ayuda de un rastrillo y los hongos se repicaron en el centro. Las cajas fueron observadas periódicamente para observar si existió un halo inhibitorio del crecimiento de la bacteria.

ENSAYO EN INVERNADERO CON *TRITICUM AESTIVUM*

DISEÑO EXPERIMENTAL

Con un diseño factorial y completamente aleatorizado se evaluó el efecto de los endofitos en distintos sustratos sobre el crecimiento de *Triticum aestivum*. El factor “endofito” con tres niveles: *Cladosporium sphaerospermum* (E1), *Coniothyrium cerealis* (E2) y sin endofito (E-), y el factor “sustrato” con dos niveles, sustrato rico (R+) y sustrato pobre (R-).

Tabla IV-2. Tratamientos resultantes del diseño experimental en el ensayo en invernáculo. R-, sin agregado adicional de rastrojo; R+, con agregado de rastrojo al 5% p/p; E-, sin endofito; E1, *Cladosporium sphaerospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*.

| | R- | R+ |
|-----------|-------|-------|
| E- | E- R- | E- R+ |
| E1 | E1 R- | E1 R+ |
| E2 | E2 R- | E2 R+ |

En la tabla IV-3 se muestran todos los tratamientos. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento, las que se cosecharon a los 60 días, momento en el que se registró la etapa de desarrollo en la que encontró cada planta y se midieron las siguientes variables respuesta: área foliar, N° de hojas, peso seco de vástago (PSV), peso seco de raíz (PSR).

ARMADO DE LAS MACETAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se emplearon macetas de 900 cm³, las que se llenaron con 800 cm³ del sustrato estéril, pobre o rico, según el tratamiento. El sustrato pobre consistió en una mezcla de suelo:perlita:vermiculita en una proporción 1:1:1, y para el sustrato rico se le agregó rastrojo de soja molido al 5% (p/p) al sustrato pobre. Una vez colocado el sustrato, se hizo un pequeño orificio en él, para colocar la plántula de trigo ya inoculada con cada endofito o sin inocular, según el tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados fueron analizados estadísticamente a través del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) seguido de un análisis discriminantes, con el programa estadístico InfoStat (di Rienzo et al. 2013).

RESULTADOS

ENSAYO EN INVERNADERO CON *GLYCINE MAX*

En la Tabla IV-3 se presenta el registro de los estados fenológicos que presentaron las plantas en el momento de la cosecha, en la que se puede observar que en presencia de *Coniothyrium cerealis* las plantas presentaron un retraso en el desarrollo.

Tabla IV-3. Registro de los estados fenológicos presentados en el momento de la cosecha (60 días después de la siembra), en cada tratamiento recibido. R-, sin agregado de rastrojo; R+, con agregado de rastrojo; B-, sin bacteria, B+, con bacteria.

| | E- | | E1 | | E2 | |
|----|------------------------|-------|--------------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | (control sin endofito) | | <i>(Cladosporium sphaerospermum)</i> | | <i>(Coniothyrium cerealis)</i> | |
| | R- | R+ | R- | R+ | R- | R+ |
| B- | R3-R4 | R3-R4 | R3-R4 | R3-R4 | R1-R2 | R1 |
| B+ | R3-R4 | R3-R4 | R3-R4 | R3-R4 | R3 | R1-R2 |

En la prueba de inhibición realizada en LB, los endofitos no inhibieron el crecimiento de *B. japonicum*.

El MANOVA reveló diferencias significativas en el ensayo en invernadero con *G. max*. Lo que indica que al menos uno de los tratamientos difieren significativamente de del resto. El análisis discriminante produjo dos funciones discriminantes (Tabla 4), en base a los resultados obtenidos, éste logró discriminar entre algunos de los tratamientos, las variables que mas pesaron para obtener dicha discriminación entre los grupos, fueron las que mayor valor presentaron, en módulo, en las funciones discriminantes de la Tabla IV- 4.

El eje canónico 1 (EC1, 76% de la varianza explicada), como se puede observar en la tabla 4, se basó principalmente en las variables: área foliar y peso seco del vástago (PSV). Ubicando los tratamientos mayor valor de éstas variable a la derecha del gráfico y los de menor valor a la izquierda (Figura 1).

El eje canónico 2 (EC2, 15% de la varianza explicada), como se puede observar en la tabla 6, se basó principalmente en las variables: área foliar y longitud de vástago. Este eje permitió ubicar en la parte superior los tratamientos con mayor área foliar y número de

vainas, mientras que ubicó en la parte inferior los que presentaron mayor desarrollo de la raíz (Figura 1).

El gráfico del análisis discriminante, refleja que todos los tratamientos con rastrojo presentaron un crecimiento menor (agrupados a la izquierda del gráfico), ya sea en presencia o en ausencia de la bacteria (Figura 1). En ese grupo de tratamientos, con menor crecimiento, sin embargo presentó diferencias significativas, donde existió promoción del crecimiento por parte de los dos endofitos en tratamiento con rastrojo y sin bacteria, ($R+B-E1, R+B-E2 > R+B-E-$), en cambio en presencia de bacteria la respuesta fue principalmente neutra en el caso de E1 y negativa con E2 ($R-B-E2 < R-B-E- = R-B-E1$). En los tratamientos sin rastrojo ni bacteria, como se puede observar en la Figura 1, los endofitos se comportaron de modo similar, inhibiendo el crecimiento de la planta ($R-B-E1, R-B-E2 < R-B-E-$). En cambio, en presencia de la bacteria, E1 no alteró el crecimiento de la planta mientras que E2 se mostró perjudicial ($R-B-E2 < R-B-E- = R-B-E1$).

Tabla IV-4. Funciones discriminantes del análisis multivariado para cada eje canónico (datos estandarizados con las varianzas comunes). EC1, eje canónico 1; EC2, eje canónico 2.

| Funciones discriminantes - | | |
|----------------------------|-------|-------|
| | EC1 | EC2 |
| Long. Vástago | -0,17 | 0,63 |
| Área foliar | 0,62 | 0,75 |
| Nº hojas | 0,21 | 0,46 |
| Nº vainas | 0,51 | 0,24 |
| PSV | 0,76 | -0,1 |
| PSR | 0,56 | -0,57 |

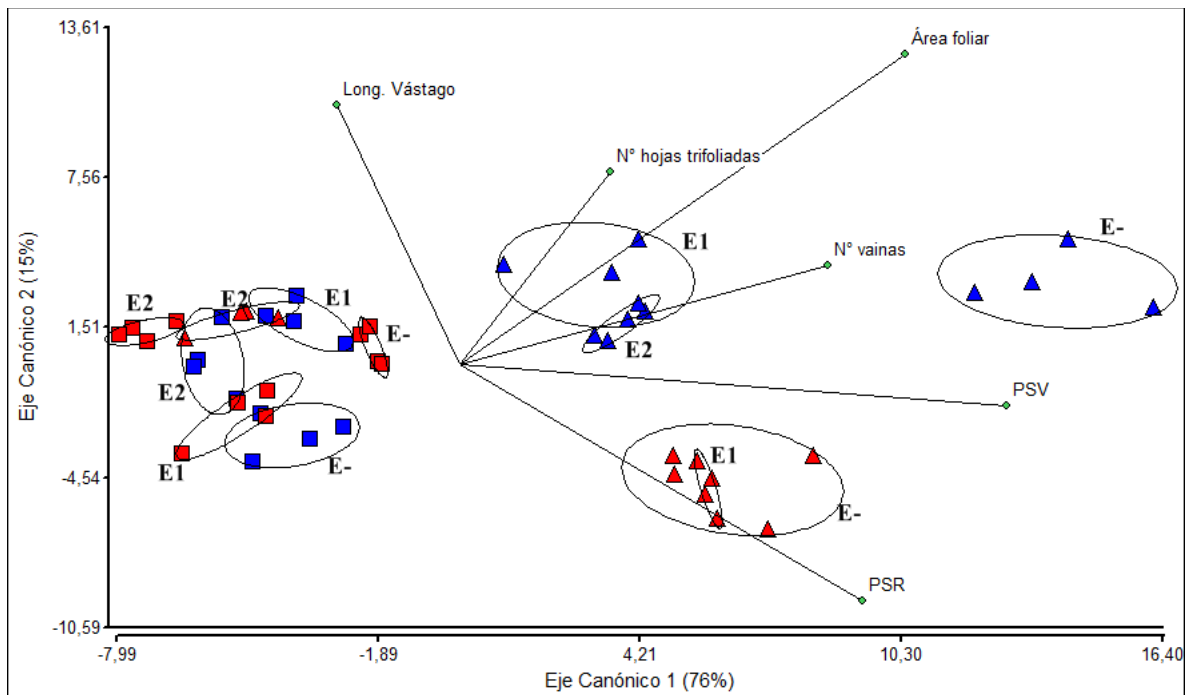


Figura IV-1. Análisis discriminante realizado con los parámetros de crecimiento del ensayo de invernadero en soja. Los símbolos: cuadrados (con rastrojo), triángulos (sin rastrojo), rojos (con bacteria), azul (sin bacteria); E-, control sin endofito; E1, *Cladosporium sphaerospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*.

En base al análisis multivariado realizado y los análisis de la varianza univariados realizados posteriormente, en la Tabla 4 se puede observar un resumen del efecto realizado por cada endofito respecto de su control. Como se puede observar, en ausencia de rastrojo (R-) en general la respuesta fue negativa, mientras que en presencia de rastrojo (R+) la respuesta fue neutra y en uno de los tratamientos fue positiva.

Tabla IV- 5. Resumen de las respuestas obtenidas, según los parámetros de crecimiento de la soja según los tratamientos recibidos. R-, sin agregado adicional de rastrojo; R+, con agregado de rastrojo al 5% p/p; B-, sin bacteria, B+, con bacteria.

| | E1: <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | | E2: <i>Coniothyrium cerealis</i> | |
|----|--|----|----------------------------------|----|
| | R- | R+ | R- | R+ |
| B- | - | + | - | + |
| B+ | = | = | - | = |

En la Figura IV-2 se representan las variables con diferencias significativas a favor del crecimiento de la planta, donde en la presencia de los dos endofitos se observó un

incremento del área foliar, y en el número de hojas en el caso de *Cladosporium sphaerospermum* (E1).

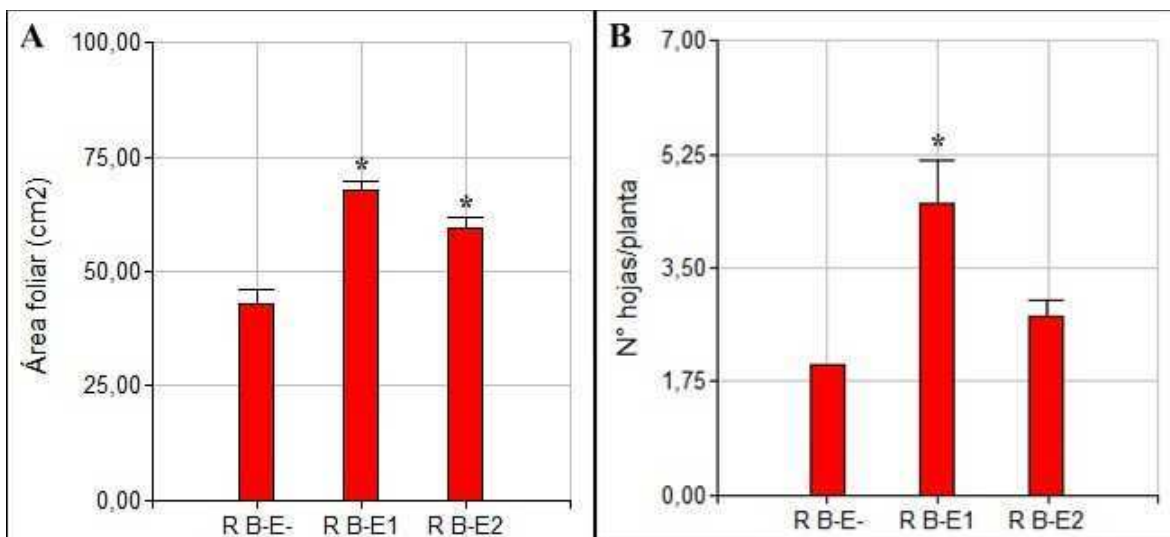


Figura IV-2. Variables que presentaron diferencias significativas que favorecieron el crecimiento de la soja, en los tratamientos con rastrojo. A, área foliar. B, Número de hojas trifoliadas por planta. E-, control sin endofito; E1, *Cladosporium phaerospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*. Las barras con distinta cantidad de asteriscos difieren significativamente ($p < 0,05$).

Además, se observó que el número de nódulos en la raíz aumentó en presencia de los endofitos. Esta diferencia existió particularmente en presencia de rastrojo con E1 y en ausencia de rastrojo y E2.

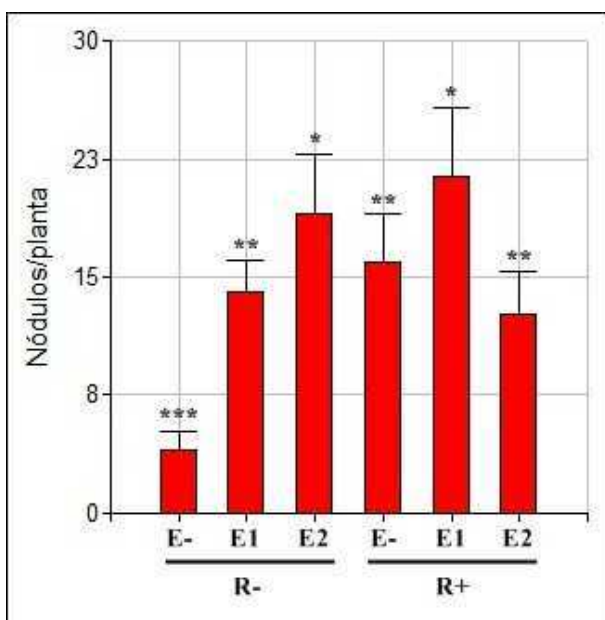


Figura IV-3. Nódulos que presentaron las raíces de soja en cada tratamiento con inoculante. E-, control sin endofito; E1, *Cladosporium phaerospermum*;

E2, *Coniothyrium cerealis*; R-, sin rastrojo; R+, con rastrojo. Las barras con distinta cantidad de asteriscos difieren significativamente ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la Firura IV-4, en los tratamientos sin rastrojo las diferencias significativas estuvieron dadas principalmente por el peso seco del vástago (PSV), donde ambos endofitos inhibieron el crecimiento ($R+B-E1, R+B-E2 < R+B-E-$). En cambio, en presencia de la bacteria el comportamiento fue distinto, el endofito E1 mostró una respuesta neutral, mientras que el E2 continuó siendo negativa ($R+B-E2 < R+B-E- = R+B-E1$). Cabe destacar que el crecimiento de la planta también fue inhibido frente a la presencia de la bacteria ($R-B+E-<R-B-E-$).

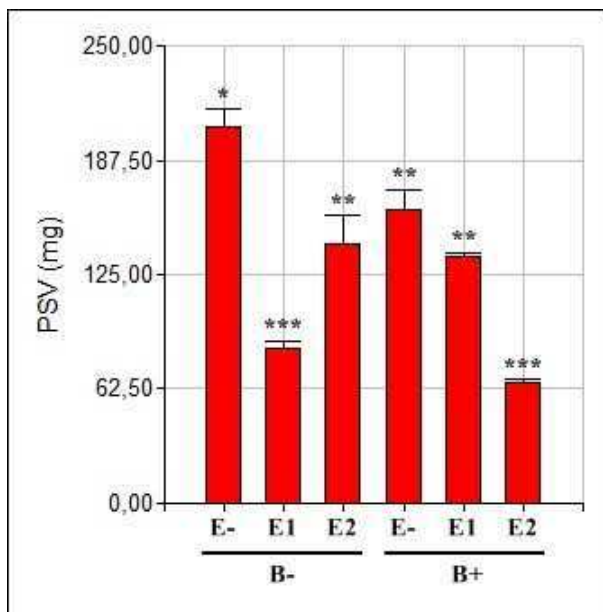


Figura IV-4. Peso seco del vástago (PSV) de soja. Tratamientos sin rastrojo. E-, control sin endofito; E1, *Cladosporium phaeospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*; B-, sin bacteria; R+, con bacteria. Las barras con distinta cantidad de asteriscos difieren significativamente ($p < 0,05$).

ENSAYO EN INVERNADERO CON *TRITICUM AESTIVUM*

El MANOVA reveló diferencias significativas. El análisis discriminante produjo dos funciones discriminantes (Tabla IV-6). El eje canónico 1 (98% de la varianza explicada) y el eje canónico 2 (1% de la varianza explicada) reflejan que la mayoría de los tratamientos con rastrojo presentaron un crecimiento menor (Figura IV- 8). El único tratamiento con rastrojo que presentó promoción del crecimiento de la planta fue el del endofito E1. En los tratamientos sin rastrojo, los endofitos se comportaron de modo similar, inhibiendo el crecimiento del trigo, por lo que está ubicado a la derecha del gráfico.

El eje canónico 1 (EC1) explica casi la totalidad de la variabilidad existente, para esto se basa, como se puede observar en la Tabla IV-5, principalmente en las siguientes variables: área foliar, peso seco del vástago (PSV) y peso seco de la raíz (PSR).

Tabla IV-5. Funciones discriminantes del análisis multivariado para cada eje canónico (datos estandarizados con las varianzas comunes).

- Funciones discriminantes -

| | EC1 | EC2 |
|---------------|-------|-------|
| Long. Vástago | -0,36 | 0,72 |
| Área foliar | 0,89 | -0,27 |
| Nº hojas | 0,31 | 0,18 |
| PSV | 1,07 | 0,39 |
| PSR | 0,72 | 0,63 |

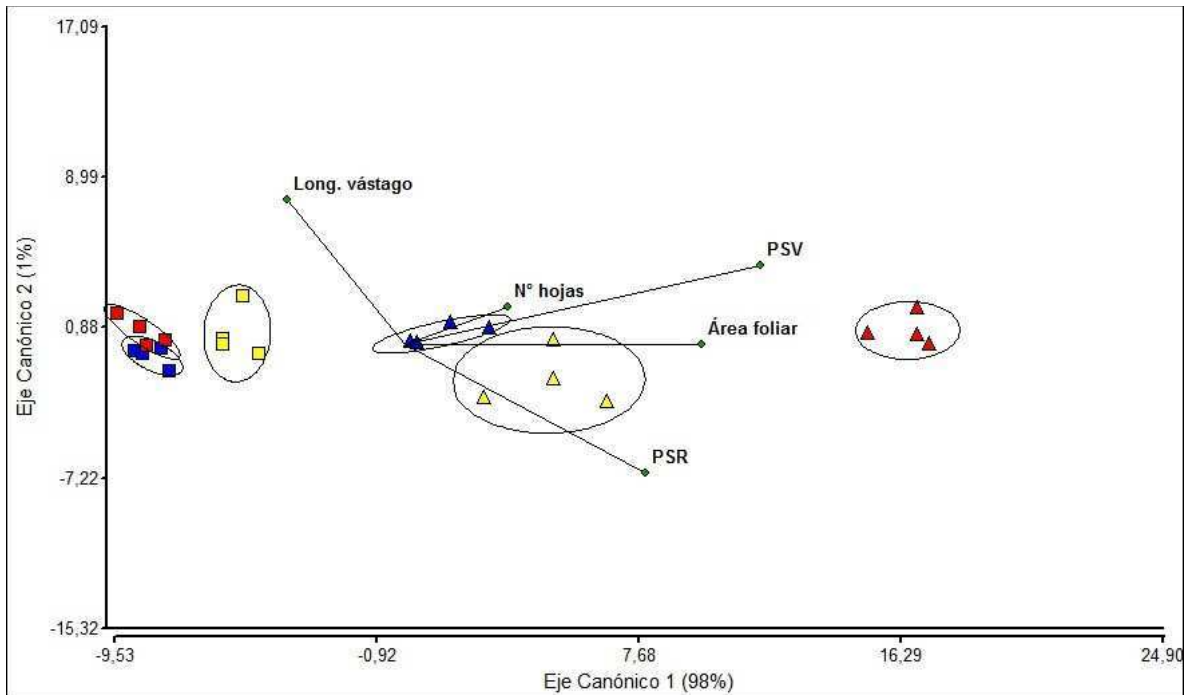


Figura IV- 5. 4. El primer (EC1) y segundo (EC2) ejes del análisis discriminante en el ensayo de invernadero con *G. max*. Los símbolos: cuadrados (con rastrojo), triángulos (sin rastrojo); rojos, E- (control sin endofito); amarillos, E1 (*Cladosporium phaeospermum*); azules, E2 (*Coniothyrium cerealis*).

Tabla IV-6. Resumen de las respuestas obtenidas, según los parámetros de crecimiento del trigo. R-, sin agregado adicional de rastrojo; R+, con agregado de rastrojo.

| E1: <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | | E2: <i>Coniothyrium cerealis</i> | |
|--|----|----------------------------------|----|
| R- | R+ | R- | R+ |
| - | + | - | = |

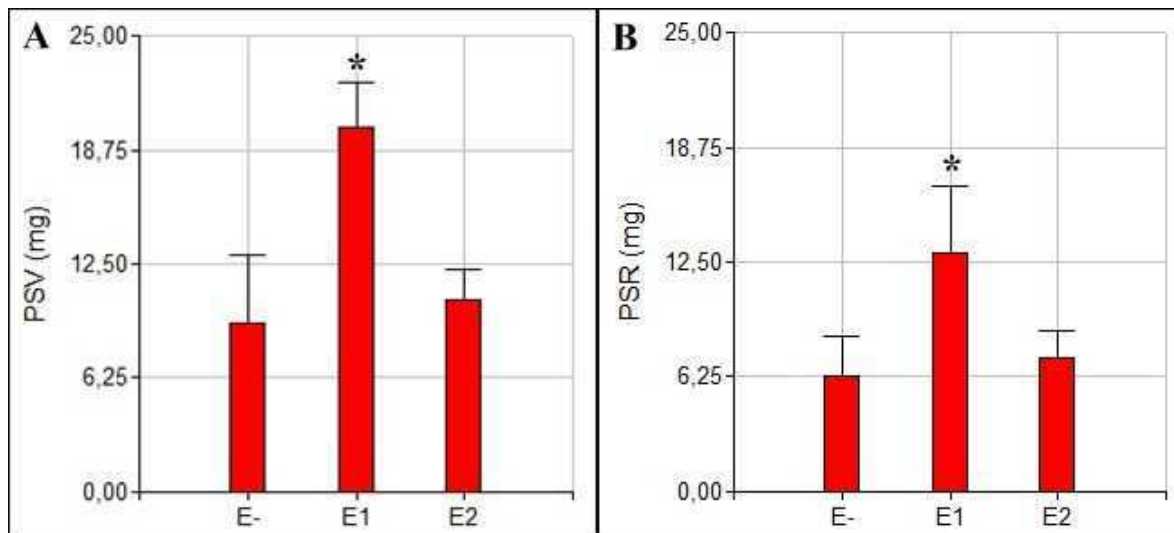


Figura IV-6. Variables que presentaron diferencias significativas que favorecieron el crecimiento del trigo. A, peso seco del vástago (PSV). B, peso seco de raíz (PSR). E-, control sin endofito; E1, *Cladosporium phaeospermum*; E2, *Coniothyrium cerealis*. Las barras con distinta cantidad de asteriscos difieren significativamente ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió la factibilidad de la utilización de dos hongos DSE como bio-inoculantes, en dos plantas cultivadas extensivamente en Argentina, soja (*Glycine max*) y trigo (*Triticum aestivum*).

El endofito de raíz *Cladosporium sphaerospermum*, en presencia de rastrojo, promovió el crecimiento en soja y trigo. En el caso de *Coniothyrium cerealis*, aunque en soja con rastrojo incrementó el área foliar, su respuesta en el resto de los tratamientos fue negativa. Estos resultados indican que *C. sphaerospermum* podría estar involucrado en la nutrición de las plantas. Este comportamiento podría guardar relación con las capacidades evaluadas en capítulos anteriores, tales como la utilización de fuentes orgánicas de Nitrógeno, producción de enzimas capaces de degradar celulosa y producción de ácido indol acético (AIA). La promoción del crecimiento en soja, si bien no es comparable con el ensayo de invernadero, ya había sido observada en los ensayos de facilitación y translocación realizados en este trabajo. Esta especie ya ha sido citada como promotor de crecimiento de soja, pero en condiciones *in vitro* (Hamayun y col. 2009), donde sus exudados, incrementaron el peso seco de plántulas. Los autores atribuyen esta propiedad a la presencia de giberelinas producidas por *C. sphaerospermum*. Siendo esta la primera evidencia de promoción del crecimiento en condiciones de invernadero. Si bien falta mucho por descubrir acerca de los mecanismos que emplea este hongo para promover el crecimiento vegetal, en esta tesis se presentan fuertes evidencias de que, además de producir una hormona vegetal, este hongo podría estar involucrado en la nutrición de su planta hospedante, particularmente a partir de fuentes de nitrógeno simple (val, *in vitro*) y en presencia de restos vegetales (rastrojo de soja, en invernadero).

Además, es sabido que la rizosfera está poblada de microorganismos que subsisten con compuestos liberados por las raíces de las plantas y que, a su vez, pueden favorecer la absorción de nutrientes que de otro modo no estarían disponibles en el suelo (Lugtenberg y Kamilova 2009). Entre las clases de compuestos exudados por las raíces

de las plantas, los aminoácidos se consideran generalmente el segundo tipo más abundante, siendo los azúcares los predominantes (Jaeger et al., 1999). Por lo que *C. phaeospermum* con su capacidad para utilizar los aminoácidos, podría cumplir este importante rol en la rizósfera, mineralizando el nitrógeno a partir de los aminoácidos.

La aplicación de microorganismos en cualquier sistema y en el sistema agrícola, en particular, requiere del cumplimiento de una serie de etapas antes de la producción del bio-inoculante, las evidencias expuestas en este trabajo forman parte de las primeras etapas, fundamentales en la búsqueda de bio-inoculantes como lo son, aislamiento, identificación, caracterización, ensayos in vitro y en condiciones controladas de invernadero. En el caso particular de los DSE, existen muchos trabajos que proponen que estos microorganismos, como los hongos MA, otorgan diversos beneficios a las plantas hospedantes (Jumponen y Trappe 1998, Mandyam y Jumponen 2005), sin embargo hay pocos trabajos que realizan este tipo de evaluaciones.

En el caso del ensayo con plantas de soja, en ausencia de rastrojo, la respuesta de los DSE evaluados fue negativa a neutra, si bien no se desarrollaron síntomas de enfermedad, el crecimiento de las plantas fue inhibido o afectado en ausencia de la bacteria, por ambos endofitos y únicamente por *C. cerealis* en presencia de la bacteria. Cabe destacar que el control sin hongo, pero con bacteria, también inhibió el crecimiento de la soja. Este comportamiento podría atribuirse a que los recursos son limitantes y los microorganismos y la planta compiten por los recursos disponibles o que hay una pérdida de energía invertida en el proceso de nodulación, causando, por ende, una disminución, del crecimiento del vástago..

En el trabajo realizado por Navarro (2008) se evaluó el efecto de *Dreschlera* sp., un hongo DSE, sobre el crecimiento en trigo, soja y tomate, utilizando el mismo sustrato de crecimiento, comparable con nuestros tratamientos sin rastrojo. La autora encontró diferencias significativas positivas únicamente en tomate, en la longitud del vástago, mientras que en las otras plantas la respuesta fue neutra. En contraposición con nuestros resultados, este DSE, no afectó el crecimiento de las plantas. En este sentido, sería importante determinar en ensayos futuros la disponibilidad nutrientes en el sustrato de

crecimiento, de esta manera podría estudiarse de forma más precisa, si existe una relación entre los nutrientes disponibles en el suelo y las interacciones resultantes entre los DSE y las plantas. De este modo se podrá comprender mejor, si la promoción crecimiento o inhibición del crecimiento de la planta, se encuentran estrechamente relacionados con la disponibilidad de nutrientes del suelo.

La presencia de los endofitos favoreció el establecimiento de la simbiosis entre *G. max* y *Bradyrhizobium japonicum*, incrementando el número de nódulos. Este efecto fue evidente en los tratamientos sin agregado de rastrojo, sin embargo, también se observó en los tratamientos R+. Además, en el caso de los tratamientos inoculados con los endofitos, los resultados difirieron según el endófito. Mientras *C. sphaerospermum* mostró mayores incrementos en la nodulación en presencia de rastrojo, *C. cerealis* mostró mayores incrementos en ausencia de rastrojo. Por otra parte cabe aclarar que, en plantas sin endofitos, la presencia de rastrojo favoreció la nodulación, por lo que la presencia de *C. sphaerospermum* no alteró este comportamiento, pero sí lo hizo. El aumento del número de nódulos no estuvo directamente relacionado con el crecimiento de las plantas, podría deberse a que la planta debe invertir energía para la formación de los nódulos, por lo que es posible que se traduzca en disminución del tamaño de la planta, particularmente en condiciones nutricionalmente pobres. Según indican estos resultados, la presencia de los DSE puede modular la simbiosis de *B. japonicum* con su hospedante, en este caso de manera positiva. Resultados similares fueron observados por Machado y col. (2011), ellos encontraron que la co-inoculación de rizobios con *Trichoderma harzianum* en *Lotus corniculatus* promovió el crecimiento de las plántulas. Estos resultados indican que, en ciertos casos, los hongos DSE podrían favorecer el establecimiento de estas simbiosis, beneficiosas para las plantas. Es posible que la actividad de *C. sphaerospermum* y *C. cerealis* en la rizósfera favorezca el crecimiento de *B. japonicum*, lo que podría traducirse en un aumento de los puntos de infección entre esta bacteria y las plantas, lo que aumentaría la cantidad de nódulos. Todos estos resultados hacen necesario, encarar estudios adicionales, que permitan establecer el grado de relación ejercido por estos endofitos sobre cada una de las simbiosis.

Llamativamente, como se puede observar en los análisis discriminantes, en el ensayo de trigo y soja sin bacteria, se obtuvo el mismo patrón de crecimiento, donde, en los tratamientos sin rastrojo, la presencia de los endofitos inhibió el crecimiento de las plantas. En el tratamiento con rastrojo *C. sphaerospermum* promovió el crecimiento de ambos hospedantes, mientras que *C. cerealis* lo hizo sólo en soja. De estos resultados se desprende que, en estas condiciones, el tipo de interacción resultante estaría principalmente determinado por la naturaleza del endofito y las condiciones nutricionales del sustrato de crecimiento. El rastrojo de soja es material rico en Nitrógeno, este se encuentra inmovilizado, por lo que en la nutrición del trigo es fundamental la mineralización del nitrógeno, que depende de los microorganismos del suelo (Ernst y col. 2002), en especial los microorganismos como *C. sphaerospermum*, que por su carácter endofítico mantiene una estrecha relación con las raíz, es capaz de mineralizar fuentes orgánicas e incluso produce fitohormonas. En base a estos resultados se podría considerar en futuros estudios que evalúen con profundidad su rol en la nutrición vegetal y su potencial uso como bio-inoculante. Este trabajo es el primer reporte de Argentina en demostrar la promoción del crecimiento en soja y trigo inducida por un DSE.

CONCLUSIONES

- ✓ Las raíces de *Glycine max* alberga una alta diversidad de hongos dematiáceos, incluidos en al menos 12 géneros distintos.
- ✓ La identificación molecular es una valiosa herramienta, sin embargo, el éxito en la identificación mediante los ITS tiene sus debilidades, por lo que resulta imprescindible tener en cuenta, en caso de presentarse, los caracteres morfológicos, con el fin de lograr una identificación certera. El uso de otros genes como marcadores moleculares debe considerarse en cada grupo en particular. Los análisis filogenéticos resultan de suma importancia para definir casos en los que el alineamiento con las bases de datos son ambiguos.
- ✓ Las comunidades de hongos varían principalmente en el tiempo, siendo menos diversas en estadios fenológicos más avanzados. Sin embargo, es un aspecto que deberá estudiarse en detalle.
- ✓ Los hongos septados oscuros presentan un amplio rango de respuestas sobre la planta hospedante, por lo que es necesario estudiar cada especie por separado.
- ✓ Las dos especies más frecuentes, *Alternaria alternata* y *Paraphoma radicina*, resultaron principalmente perjudiciales para *G. max*.
- ✓ El modo de colonización podría servir como indicativo del tipo de interacción. Además de respuestas en los tejidos tales como el desarrollo de papilas o la desorganización de los mismos, los aislamientos perjudiciales suelen presentar una colonización predominantemente perpendicular al eje mayor de la raíz, llegando a colonizar, inclusive, el cilindro vascular. Por su parte, los aislamientos que resultaron ser inocuos crecieron principalmente entre las células de la rizodermis y la corteza, y en forma paralela al eje mayor de la raíz, además de no originar reacciones evidentes en los tejidos de la planta hospedante.
- ✓ Las capacidades enzimáticas celulolíticas y pectinolíticas podrían estar relacionadas con el tipo de relación que se establece entre el hongo y la planta, caracterizando principalmente a los patógenos necrótrofos.
- ✓ Los DSE son capaces de utilizar fuentes orgánicas simples, aunque para esto necesita de fuentes de Carbono en exceso. *C. sphaerospermum* promovió el crecimiento de *G. max* en el ensayo de facilitación y en el de translocación. Lo que

indica que esta implicado en la nutrición de la planta, mediante la facilitación de fuentes de Nitrógeno inmediatas y lejanas.

- ✓ *Cladosporium sphaerospermum* es capaz de promover el crecimiento de *G. max*, en condiciones *in vitro*, lo que puede ser atribuido partir de la mineralización del Nitrógeno contenido en la valina, particularmente en condiciones donde el C es limitante, y a la capacidad que presenta este hongo de producir AIA.
- ✓ En condiciones controladas de invernadero en plantas de *G. max* y *T. aestivum*, *Cladosporium sphaerospermum* mostró el mismo comportamiento que en ensayos en cámara de cultivo realizados con *G. max*. Efectivamente en presencia de altos niveles de fuentes orgánicas, es decir cuando el sustrato fue complementado con rastrojo, promovió el crecimiento vegetal. .
- ✓ *Cladosporium sphaerospermum* no impidió el establecimiento de la simbiosis *G. max*-bacteria fijadora de Nitrógeno, por el contrario la favoreció.
- ✓ Los resultados obtenidos en el caso particular de *Cladosporium sphaerospermum*, determinan el potencial de este endofito un potencial bio-inoculante para los cultivos de soja y trigo.

BIBLIOGRAFÍA

- Addicott, J. (1984). Mutualistic interactions in population and community processes. En P. Price, C. Slobodchikoff, & W. Gaud (Eds.), *International Association for Plant Taxonomy A New Ecology: Novel Approaches to Interactive Systems*. (pp. 437-455). New York: Cambridge University Press.
- Addy, H. D., Piercey, M. M., & Currah, R. S. (2005). Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 1-13. <http://doi.org/10.1139/b04-171>
- Agrios, G. (1995). *Fitopatología* (2da edición). Mexico: Editorial Limusa.
- Ahlich, K., & Sieber, T. N. (1996). The profusion of dark septate endophytic fungi in non-ectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. *New Phytologist*, 132(2), 259-270. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01845.x>
- Albornoz, P., Varela, O., & Díaz Ricci, J. (2014). Micorrizas arbusculares y endófitos septados oscuros en tres especies de Rosáceas de Argentina. *Revista Agronómica del noroeste argentino*, 51(1), 9-19.
- Arnold, a. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. a. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3(4), 267-274. <http://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00159.x>
- Aveskamp, M. M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise Phoma and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1-60. <http://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Bacon, C., & White, J. (2000). *Microbial endophytes*. New Brunswick: CRC Press.
- Baigorri, H., & Pereyra, V. (2000). El INTA y el Desarrollo de la Soja en la Argentina. En *SOJA* (pp. 19-23). Buenos Aires.
- Barrow, J., & Aaltonen, R. (2001). Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 11(4), 199-205.
- Barrow, J. R. (2003). Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, 13(5), 239-247. <http://doi.org/10.1007/s00572-003-0222-0>
- Barrow, J. R., & Osuna, P. (2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing salt bush, *Atriplex canescens* (Pursh). *Journal of Arid Environments*, 51(3), 449-459.

- Bartholdy, B. A., Berreck, M., & Haselwandter, K. (2001). Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *BioMetals*, 14(1), 33-42. <http://doi.org/10.1023/A:1016687021803>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bledsoe, C., Klein, & Bliss, L. (1990). A survey of mycorrhizal plants on Truelove Lowland, Devon Island, N.W.T., Canada. *Canadian Journal of Botany*, 68, 1848–1856.
- Bronstein, J. L. (1994). Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in ecology & evolution*, 9(6), 214-217. [http://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90246-1](http://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90246-1)
- Butler, M., Gardiner, R., & Day, A. (2005). Fungal melanin detection by the use of copper sulfide-silver. *Mycologia*, 97:312-9.
- Cabrera, M., Cúndom, M., Gutiérrez, S., & Álvarez, R. (2006). *Situación de la mancha anillada (Corynespora casicola) de la soja en provincias del NE de Argentina*. Corrientes.
- Caldwell, B., Jumpponen, A., & Trappe, J. M. (2000). Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. *Mycologia*, 92(2), 230-232.
- Caviglia, O., & Andrade, F. (2010). Sustainable Intensification of Agriculture in the Argentinean Pampas: capture and use efficiency of environmental resources. *Americas J. Plant Sci. Biotech.*, 3(1), 1-8.
- Cisneros, G., Rothen, C., Lo, T., Godeas, A. M., & Rodríguez, M. (2010). . Aislamiento y selección de hongos endófitos septados oscuros degradadores de agroquímicos como potenciales herramientas en la biorremediación de suelos. *III congreso Argentino de la sociedad de toxicología y química ambiental SETAC. Santa Fe. Argentina*.
- Cisneros, G. S. (2011). *Aislamiento e identificación de endofitos septados oscuros. Tolerancia al fungicida carbendazim y efectos en plantas de trigo en presencia y ausencia del agroquímico*. [Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas]. Argentina:Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Cofré, N., Becerra, A., Nouhra, E., & Soterias, F. (2012). Arbuscular mycorrhizae and dark-septate endophytes on *Atriplex cordobensis* in saline sites from Argentina. *Journal of Agricultural Technology*, 8(7), 2201-2214.
- Coto, G. (1999). *Conceptos Introductorios a la Fitopatología*. Buenos Aires: EUNED.
- Currah, R. S., Tsuneda, A., & Mukarami, S. (1993). Morphology and ecology of *Phialocephala fortinii* in roots of *Rhododendron brachycarpum*. *Canadian Journal of Botany*, 71(12), 1639-1644.
- De Emilio, M. (2015). *Mercado de granos: en soja, los precios que vienen son más altos que los actuales*. Santa Fe.

- De Gruyter, H., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Redisposition of phoma-like anamorphs in pleosporales. *Studies in Mycology*, 75, 1-36. <http://doi.org/10.3114/sim0004>
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). *Compendium of soil fungi* (Academic P). London: Academic press.
- Edel, V. (1998). Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. En B. P. . A. D. . R. C. y E. R. (Ed.), *Applications of PCR in Mycology* (pp. 1-20). UK: University Press.
- El-Elimat, T., Raja, H., Figueroa, M., Falkinham, J., & Oberlies, N. (2014). Isochromenones, isobenzofuranone, and tetrahydronaphthalenes produced by *Paraphoma radicina*, a fungus isolated from a freshwater habitat. *Phytochemistry*, 104, 114-120.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew.
- Ernst, O., Bentancur, O., & Borges, R. (2002). Descomposición de rastrojo de cultivos en siembra sin laboreo: trigo, maíz, soja y trigo después de maíz o de soja. *Agrociencia*, 20-26.
- FAO. (1999). *The multifunctional character of agriculture and land*. United Nations, Food and Agriculture Organization, United Nations, Food and Agriculture Organization. Rome.
- Fehr, W., Caviness, C., Burmood, D., & Pennington, J. (1971). Stage of Development Descriptions for Soybeans *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11, 929-931.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 20, 783-791. <http://doi.org/10.2307/2408678>
- Fernández, N., Fontenla, S., & Messuti, M. (2010). Mycorrhizal Status of Obligate and Facultative Epiphytic Ferns in a Valdivian Temperate Forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal*, 100(1), 16-26. <http://doi.org/10.1640/0002-8444-100.1.16>
- Fernández, N., Messuti, M., & Fontenla, S. (2008). Arbuscular Mycorrhizas and Dark Septate Fungi in *Lycopodium paniculatum* (Lycopodiaceae) and *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) in a Valdivian Temperate Forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal*, 98(3), 117-127. [http://doi.org/10.1640/0002-8444\(2008\)98\[117:AMADSF\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1640/0002-8444(2008)98[117:AMADSF]2.0.CO;2)
- Fracchia, S., Aranda, A., Gopar, A., Silvani, V., Fernandez, L., & Godeas, A. (2009). Mycorrhizal status of plant species in the Chaco Serrano Woodland from central Argentina. *Mycorrhiza*, 19(3), 205-214. <http://doi.org/10.1007/s00572-009-0231-8>
- Fracchia, S., Silvani, V., Flachsland, E., Terada, G., & Sede, S. (2014). Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr, a terrestrial orchid endemic from Argentina. *Mycorrhiza*, 24(1), 35-43. <http://doi.org/10.1007/s00572-013-0510-2>
- Fucks, E., Blasi, A., Carbonari, J., Huarte, R., & Pisano, F. (2011). Evolución geológica-geomorfológica de la cuenca del Río Areco, NE de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Asoc. Argent.*, 68(1), 108-119.

- Fuentes-Ramirez, L. E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R., & Caballero-Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, 154(2), 145-150. <http://doi.org/10.1007/BF00012519>
- García, I., Mendoza, R., & Pomar, M. (2012). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 155, 194-201. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2012.04.020>
- Gasoni, L., & De Gurfinkel, B. (1997). The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research*, 101(7), 867-870. <http://doi.org/10.1017/S0953756296003462>
- Gay, G., & Debaud, J. (1986). Preliminary study of IAA synthesis by ericoid endomycorrhizal fungi. En V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. (pp. 677-682). PARIS:ScholarlyEditions.
- Gomez, B., & Nosanchuk, J. (2003). Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis.*, 16, 91-96.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1950). Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant physiology*, 3, 192-195.
- Graham, J. H., & Eissenstat, D. M. (1994). Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. *Plant and Soil*, 159(1), 179-185. <http://doi.org/10.1007/BF00000107>
- Grilli, G., Urcelay, C., & Galetto, L. (2013). Linking mycorrhizal fungi and soil nutrients to vegetative and reproductive ruderal plant development in a fragmented forest at central Argentina. *Forest Ecology and Management*, 310, 442-449. <http://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.08.052>
- Groth, J.V. and Roelfs, A. P. (1987). The concept of measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology*, 77, 1394-1399.
- Grünig, C., Brunner, P., Duò, A., & Sieber, T. (2007). Suitability of methods for species recognition in the *Phialocephala fortinii*-*Acephala applanata* species complex using DNA analysis. *Fungal Genetics and Biology*, 44(8), 773-788. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.12.008>
- Grünig, C., Queloz, V., Duò, A., & Sieber, T. (2009). Phylogeny of *Phaeomollisia piceae* gen. sp. nov.: a dark, septate, conifer-needle endophyte and its relationships to *Phialocephala* and *Acephala*. *Mycological Research*, 113(2), 207-221. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.10.005>
- Grünig, C. R., Queloz, V., Sieber, T. N., & Holdenrieder, O. (2008). Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l. - *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany-Botanique*, 86(12), 1355-1369. <http://doi.org/10.1139/b08-108>

- Guerrero Garcia, A. (1998). *Cultivos herbáceos extensivos*. Madrid: Mundi Prensa.
- Gutiérrez, M., Alvarez, S., Roberto, E., Gómez, M., & Diana, E. (2002). *Podredumbre carbonosa (Macrophomina phaseolina), en soja sometida a estrés hídrico en el Nordeste de la Argentina*.
- Hamayun, M., Afzal Khan, S., Ahmad, N., Tang, D. S., Kang, S. M., Na, C. I., ... Lee, I. J. (2009). Cladosporium sphaerospermum as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of Glycine max (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 627-632. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-9982-9>
- Hardham, A., & Mitchell, H. (1998). Use of molecular cytology to study the structure and biology of phytopathogenic and mycorrhizal fungi. *Fungal Genet Biol*, 24, 252–284.
- Harney, S. K., Rogers, S. O., & Wang, C. J. K. (1997). Molecular characterization of dematiaceous root endophytes. *Mycological Research*, 101 (11), 1397-1404. <http://doi.org/10.1017/S095375629700419X>
- Harrison, M. (1999). Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. *J Exp Bot*, 50, 1013–1022.
- Haselwandter, K., & Read, D. (1980). Fungal associations of roots of dominant and sub-dominant plants in high-alpine vegetation systems with special reference to mycorrhiza. *Oecologia*, 45, 57–62.
- Herrera Parra, E., Bacab, I. M., Jairo Cristóbal Alejo, J. M. P., Suárez, T., & Esaú Ruiz Sánchez, E. (2011). Patogenicidad de Fusarium solani (Mart.) Sacc. y Alternaria alternata (Fries) Keissler en Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum. y su control in vitro. *Fitosanidad*, 15(4).
- Hwang, U. W., & Kim, W. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean Journal of Parasitology*. <http://doi.org/10.3347/kjp.1999.37.4.215>
- Hyde, K., Jones Gareth, E. B., Liu, J., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., ... Zhang. (2013). Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63(1), 1-313. <http://doi.org/10.1007/s13225-013-0263-4>
- Impullitti, A. E., & Malvick, D. K. (2013). Fungal endophyte diversity in soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1500-1506. <http://doi.org/10.1111/jam.12164>
- JA di Rienzo, F Casanoves, Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2013). Infostat - Software estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Johnson, N. C. (1993). Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications*, 3(4), 749-757. <http://doi.org/10.2307/1942106>
- Johnson, N. C., Graham, J. H., & Smith, F. A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135(4), 575-586. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00729.x>

- Jones, M. D., & Smith, S. E. (2004). Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? *Canadian Journal of Botany*, 82 (8), 1089-1109. <http://doi.org/10.1139/b04-110>
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11(4), 207-211. <http://doi.org/10.1007/s005720100112>
- Jumpponen, A., & Trappe, J. (1998). Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, 140(2), 295-310. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>
- Kageyama, S. A., Posavatz, N. R., Waterstripe, K. E., Jones, S. J., Bottomley, P. J., Cromack, K., & Myrold, D. D. (2008). Fungal and bacterial communities across meadow-forest ecotones in the western Cascades of Oregon. *Canadian Journal of Forest Research*, 38(5), 1053-1060. <http://doi.org/10.1139/X07-221>
- Khalid, M., Zahir, Z. a., Yasin, H. M., Naveed, M., & Anjum, M. a. (2010). L-Tryptophan application enhances the effectiveness of Rhizobium inoculation for improving growth and yield of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Pakistan Journal of Botany*, 42(3), 1771-1780.
- Krings, M., Taylor, T., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., & Hermsen, E. (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: Infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, 174(3), 648-657. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x>
- Lacap, D. C., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2003). An evaluation of the fungal ' morphotype ' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12, 53-66.
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *Arabidopsis Book*, 8, e0136.
- Larran, S., Rollán, C., Ángeles, H. B., Alippi, H. E., & Urrutia, M. I. (2002). Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Producción y protección vegetales*, 17(1), 173-178.
- Lawrence, D., Gannibal, P., Peever, T. L., & Pryor, B. M. (2013). The sections of *Alternaria*: Formalizing species-groups concepts. *Mycologia*, 105, 530-546.
- Li, T., Liu, M. J., Zhang, X. T., Zhang, H. B., Sha, T., & Zhao, Z. W. (2011). Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409(6), 1069-1074. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.012>
- Lizarraga, S. V, Ruiz, A. I., Salazar, S. M., & Albornoz, P. L. (2015). Micorrizas vesículo-arbusculares , endófitos septados oscuros y anatomía radical en *Fragaria ananassa* var . Camino Real (Rosaceae), en la provincia de Tucumán , Argentina. *Revista Agronómica del noroeste argentino*, 35, 11-17.

- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Machado, R. G., Luiz, E., Sá, S. De, Garibaldi, R., Camargo, A. D. O., & Reartes, D. S. (2011). Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio Resumo. *Ciência e Natura*, 33, 111-126.
- Magrín, G. (2003). Vulnerabilidad de la producción agrícola en la región pampeana argentina. «Informe Final» ENA.
- Mandyam, K., & Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53, 173-189. <http://doi.org/10.3114/sim.53.1.173>
- Mandyam, K., & Jumpponen, A. (2008). Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. *Mycorrhiza*, 18(3), 145-55. <http://doi.org/10.1007/s00572-008-0165-6>
- Mandyam, K., Loughin, T., & Jumpponen, A. (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4), 813-821.
- Mandyam, K., Roe, J., & Jumpponen, A. (2013). *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biology*, 117(4), 250-260. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.02.001>
- Marias, J., Wit, J., & Quicke, G. (1966). A critical Examination of the Nelson-Somogyi Method for the Determination of Reducing Sugars. *Analytical Biochemistry*, 15, 373-381.
- Marschnera, P., Kandelerb, E., & Marschnerc, B. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 453-461.
- McAlpine, D. (1902). *Fungus Diseases of Stone-fruit Trees in Australia and Their Treatment*. Australia: Brain, gobemment printer.
- Menkis, A., Allmer, J., Vasiliauskas, R., Lygis, V., Stenlid, J., & Finlay, R. (2004). Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. *Mycological research*, 108(8), 965-973. <http://doi.org/10.1017/S0953756204000668>
- Menoyo, E., Becerra, A. G., & Renison, D. (2007). Mycorrhizal associations in *Polylepis* woodlands of Central Argentina. *Canadian Journal of Botany*, 85(5), 526-531. <http://doi.org/10.1139/B07-042>
- Moe, L. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100(9), 1692-1705. <http://doi.org/10.3732/ajb.1300033>

- Naik, B. S., Shashikala, J., & 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(3), 290-296. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2006.12.003>
- Narisawa, K., Kawamata, H., Currah, R. S., & Hashiba, T. (2002). Suppression of Verticillium wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*, 108(2), 103-109. <http://doi.org/10.1023/A:1015080311041>
- Narisawa, K., Usuki, F., & Hashiba, T. (2004). Control of Verticillium Yellows in Chinese Cabbage by the Dark Septate Endophytic Fungus LtVB3. *Phytopathology*, 94(5), 412-418. <http://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.5.412>
- Nautiyal, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00555-2](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00555-2)
- Navarro, L. (2008). *Selección de hospedantes de la cepa DSE1 (Dark Septate Endophyte) y efecto sobre el crecimiento de las plantas infectadas [Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas]. Argentina:Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.*
- Newsham, K. K. (1999). Phialophora graminicola, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass Vulpia ciliata ssp. ambigua. *New Phytologist*, 144(3), 517-524. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00537.x>
- Newsham, K. K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190(3), 783-793. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03611.x>
- Newsham, K. K., Fitter, A. H., & Watkinson, A. R. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution*, 95(10), 407-411. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89157-0](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89157-0)
- Newsham, K. K., Upson, R., & Read, D. J. (2009). Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology*, 2(1), 10-20. <http://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.10.005>
- O'Connell, R., Thon, M., Hacquard, S., Amyotte, S., Kleemann, J., Torres, M., ... Vaillancourt, L. J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*. <http://doi.org/10.1038/ng.2372>
- Perotto, S., Coisson, J. D., Perugini, I., Cometti, V., & Bonfante, P. (1997). Production of pectin-degrading enzymes by ericoid mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 135(1), 151-162. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00627.x>
- Peterson, R. L., Wagg, C., & Pautler, M. (2008). Associations between microfungus endophytes and roots: do structural features indicate function? *Botany*, 86(5), 445-456. <http://doi.org/10.1139/B08-016>

- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. En *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). <http://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-181. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Piercey, M., Graham, S., & Currah, R. (2004). Patterns of genetic variation in *Phialocephala fortinii* across a broad latitudinal transect in Canada. *Mycological research*, 108(8), 955-964. <http://doi.org/10.1017/S0953756204000528>
- Pimentel, I., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R., & Azevedo, J. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5), 705-711. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132006000600003>
- Poole, R. W. (1974). *An Introduction to Quantitative Ecology*. (McGraw-Hill, Ed.). New York.
- Prud'homme, M. (2005). Global nitrogen fertilizer supply and demand outlook. *Science in China*, 48(2), 818-826. <http://doi.org/10.1360/062005-274>
- Ramos, M., Gally, M., García, M., & Levin, L. (2010). Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 168-190.
- Read, D. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47(4), 376-391.
- Rodríguez, M., Rothen, C., Lo, T., Cabrera, G., & Godeas, A. (2015). Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAFC1646. *Biocontrol Science and Technology*, 1-36. <http://doi.org/10.1080/09583157.2015.1052372>
- Rodríguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New phytologist*, 182(2), 314-330. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rogerson, C. T., & Webster, J. (1981). Introduction to Fungi. *Brittonia*, 33(2), 193. <http://doi.org/10.2307/2806321>
- Rothen, C., Cisneros, G., Fernandez, L., Martinez, A., & Rodriguez, M. (2010). Identificación y caracterización de hongos DSE aislados a partir de plantas de trigo. *I congreso de microbiología agrícola y ambiental*. Buenos Aires. Argentina.
- Rothen, C. P. (2010). *Los hongos dse como microorganismos potenciales en el uso de bioinoculantes*. [Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas]. Argentina:Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

- Salgado Salomón, M., Barroetaveña, C., & Rajchenberg, M. (2013). Pseudotsuga menziesii invasion in native forests of Patagonia, Argentina: What about mycorrhizas? *Acta Oecologica*, 49, 5-11. <http://doi.org/10.1016/j.actao.2013.01.018>
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*. <http://doi.org/10.1093/aob/mct048>
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686. <http://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421. <http://doi.org/10.1017/S0953756201005196>
- Siddiqui, Z. (2006). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. En *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 111-142). Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_4
- Silvani, V., Fracchia, S., Fernández, L., Pérgola, M., & Godeas, A. (2008). A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1259-1263. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.022>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature (Lond)*, 163, 688.
- Sinclair, J. B. (1991). Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Dis*, 75, 220-224.
- Smith, S., & Read, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis* (2nd edn.). San Diego: Academic press.
- Somogyi, M. (1951). Notes on sugar determination. *Journal Biological Chemistry*, 195, 19-23.
- Stoyke, G., & Currah, R. (1991). Endophytic fungi from the mycorrhizae of alpine ericoid plants. *Can J Bot*, 69, 347-352. <http://doi.org/doi:10.1139/b91-047>
- Szabo, L., & Bushnell, W. (2001). Hidden robbers: the role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 7654-7765.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tellenbach, C., Sumarah, M. W., Grünig, C. R., & Miller, J. D. (2013). Inhibition of Phytophthora species by secondary metabolites produced by the dark septate endophyte Phialocephala europaea. *Fungal Ecology*, 6(1), 12-18. <http://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.10.003>
- Underwood, W. (2012). The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3(May), 1-6. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>

- Upton, R., Read, D. J., & Newsham, K. K. (2010). Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza*, 20(1), 1-11. <http://doi.org/10.1007/s00572-009-0260-3>
- Urcelay, C. (2002). Co-occurrence of three fungal root symbionts in *Gaultheria poeppigii* DC in Central Argentina. *Mycorrhiza*, 12(2), 89-92. <http://doi.org/10.1007/s00572-001-0146-5>
- Usuki, F., & Narisawa, K. (2007). A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia*, 99(2), 175-184. <http://doi.org/10.3852/mycologia.99.2.175>
- Vandenkoornhuyse, P., Baldauf, S. L., Leyval, C., Straczek, J., & Young, J. P. W. (2002). Extensive fungal diversity in plant roots. *Science*, 295(5562), 2051. <http://doi.org/10.1126/science.295.5562.2051>
- Villarreal-Ruiz, L., Anderson, I., & Alexander, J. (2004). Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytologist*, 164, 183-192.
- Violi, H., Menge, J., & Beaver, R. (2007). *Chaetomium elatum* (Kunze: Chaetomiaceae) as a root-colonizing fungus in avocado: is it a mutualist, cheater, commensalistic associate, or pathogen. *American Journal of Botany*, 94(4), 690-700.
- Walker, J. F., Aldrich-Wolfe, L., Riffel, A., Barbare, H., Simpson, N. B., Trowbridge, J., & Jumpponen, A. (2011). Diverse helotiales associated with the roots of three species of arctic ericaceae provide no evidence for host specificity. *New Phytologist*, 191(2), 515-527. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03703.x>
- White, T., Bruns, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. En *Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322).
- Whittaker, R. . H. . (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *International Association for Plant Taxonomy*, 21(2), 213-251.
- Wilcox, H. E., & Wang, C. J. K. (1987). Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 17(8), 884-899. <http://doi.org/10.1139/x87-140>
- Wilson, D. (1995). Endophyte the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73(2), 274-276.
- Wood, T. M., & Bhat, M. K. (1988). Methods for Measuring Cellulase Activities. En *Methods in enzymology* (Vol. 160, pp. 87-112). New York: Academic press.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212. <http://doi.org/10.3114/sim0015>

- Xu, R., Li, T., Cui, H., Wang, J., Yu, X., Ding, Y., ... Zhao, Z. (2015). Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Applied Soil Ecology*, 93, 11-18. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.03.013>
- Yu, T., Nassuth, a., & Peterson, R. L. (2001). Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8), 741-753. <http://doi.org/10.1139/cjm-47-8-741>
- Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., ... Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: A taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology*, 64, 85-102. <http://doi.org/10.3114/sim.2009.64.04>
- Zijlstra, J., P. V. H., Baar, J., Verkley, G., Summerbell, R., Paradi, I., ... Berendse, F. (2005). Diversity of symbiotic root endophytes of the Helotiales in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. *Studies in Mycology*, 53, 147-162.

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR ESTRACTO DE MALTA (AEM)

Este medio contiene cada 1000 mlde agua destilada:

| | |
|-------------------|------|
| Extracto de malta | 20g |
| Glucosa | 5 g |
| Agar | 16 g |
| pH | 5,7 |

CALDO ESTRACTO DE MALTA (CEM)

Este medio contiene cada 1000 mlde agua destilada:

| | |
|-------------------|-----|
| Extracto de malta | 20g |
| Glucosa | 5 g |
| pH | 5,7 |

NBRIP(NAUTIYAL 1999)

Este medio contiene cada 1000 mlde agua destilada:

| | |
|---|-------|
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 5 g |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 5 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,25g |
| KCl | 0,2 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0,1 g |
| Glucosa | 10 g |
| Agar | 16 g |
| pH | 7 |

MEDIO BASAL PARA INDUCCIÓN DE ENZIMAS

Este medio contiene cada 1000 ml de agua destilada:

MgSO₄.7H₂O: 0.5 g

HK₂PO₄: 0.6 g

H₂KPO₄: 0.5 g

Solución de micronutrientes A* : 2 ml

Solución de micronutrientes B* : 2 ml

Tiamina**: 100 µl

Biotina**: 50 µl

* Micronutrientes:

| Soluciones madre: | | Cantidades en el medio basal (/L): |
|---|--------|--|
| A: CuSO ₄ .5H ₂ O | 200 mg | CuSO ₄ .5H ₂ O: 0,4 mg |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 45 mg | MnCl ₂ .4H ₂ O: 0,09 mg |
| H ₃ BO ₃ | 35 mg | H ₃ BO ₃ : 0,07 mg |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 10 mg | NaMoO ₄ .2H ₂ O: 0,02 mg |
| ZnCl ₂ .H ₂ O | 1.75 g | ZnCl ₂ : 2,5 mg |
| B: FeCl ₃ 500 mg | | FeCl ₃ 1,0 mg |

** Vitaminas:

| Soluciones madre: | | Cantidades en el medio basal (/L): |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Hidrocloruro de tiamina: 1 mg/ml | Tiamina 100 µg | |
| Biotina: 100 µg/ml | Biotina 5 µg | |

MEDIO PARA INDUCCIÓN DE AIA (FUENTES RAMÍREZ ET AL. 1993)

Este medio contiene cada 1000 mlde agua destilada:

| | |
|---|---------|
| Succinato de sódio | 2,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 6 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4 g |
| KOH | 2,1 g |
| NH ₄ Cl | 1g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 0,1g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,02 g |
| FeCl ₃ | 0,01 g |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,002 |
| Triptófano* | 0,1 g |
| Glucosa ² | 2,5 g |
| Ph | 6,0-6,2 |

BASAL AGAR PARA FACILITACIÓN

Este medio contiene cada 1000 mlde agua destilada:

2

| | |
|--------------------------------------|----------|
| KCl | 201.3 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 181.5 mg |
| Na ₂ MoO ₄ | 0.02 mg |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 492.7 mg |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.05 mg |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 443.9 mg |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 5.56 mg |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 4,2 mg |
| H ₃ BO ₄ | 2,3 mg |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.22 mg |
| Ph | 5 5.0 |

LB (BERTANI 1951)

Este medio contiene cada 1000 ml de agua destilada:

| | |
|----------------------|-------|
| Peptona | 5 g |
| Glucosa | 5 g |
| Extracto de levadura | 2 g |
| NaCl | 2,5 g |
| Agar | 16 g |
| Ph | 5,7 |

REACTIVOS Y REACCIONES

REACTIVO CROMOGENICO DE SALKOWSKI

| | |
|------------------------------------|--------|
| H ₂ SO ₄ (c) | 75 ml |
| Sol FeCl ₃ (0,5M) | 3,2 ml |
| Agua destilada | 125 ml |

TÉCNICA DE SOMOGYI-NELSON

Reacción: 1) 0.5 ml de muestra + 0.5 ml Somogyi

en baño 100 °C por 15 min

se enfrían los tubos en agua

2) tubos reacción + 0.5 ml Nelson

agitar, agregar 6 ml agua

agitar por inversión

3) leer a 630 nm contra blanco de agua (0.5 ml de agua destilada + reacción)

Para calcular los micromoles o microgramos de azúcar presentes, la curva patrón debe hacerse con el mismo azúcar que se desea medir. El factor es la inversa de la pendiente de la curva de Abs vs µg de azúcar reductor (o µmoles)

Cantidad de azúcar reductor = abs x factor

