



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Carrera de Ciencias Biológicas

Aislamiento e identificación de endofitos septados asociados
a las raíces de *Bromus auleticus* en simbiosis con endofitos
de vástago *Epichloë*

Natalia Luisa Terlizzi

Director de Tesis: Dra. María Alejandra Rodríguez

Co-Director de Tesis: Dra. María Victoria Novas

Buenos Aires.

ÍNDICE

Resumen	05
Introducción general	07
Asociación planta-hongo	07
Endofitos	07
Endofitos de pastos	
Ciclo de vida.	08
Distribución y estudios de <i>Epichloë</i> en Argentina.	10
Efectos de <i>Epichloë</i> sobre el hospedante.	12
Promoción del crecimiento, reproducción y rebrote	12
Resistencia a factores bióticos y abióticos.	12
Cambios en el entorno del hospedante.	12
Endofitos septados oscuros (DSE)	
Distribución y estudios de DSE en Argentina.	13
Proceso de colonización.	14
Efectos de DSE sobre el hospedante.	16
Promoción del crecimiento, reproducción y rebrote	16
Mejoramiento en la absorción de nutrientes minerales, nutrientes orgánicos y agua.	17
Resistencia a factores bióticos y abióticos	17
Hongos micorrícicos arbusculares	
Proceso de colonización.	18
Interacciones multitróficas	20
Forrajera <i>Bromus auleticus</i>	22
Hipótesis Generales	23
Objetivos	24
Materiales y Métodos	25
Sitio y condiciones de muestreo	25
Estatus endofítico de <i>Bromus auleticus</i>	26
Lavado de raíces de <i>B. auleticus</i>	26
Cuantificación de colonización de raíces de <i>B. auleticus</i> por hongos DSE	27
Tinción de las raíces	27
Cuantificación de las raíces	27

Aislamiento de endofitos septados oscuros (DSE)

Esterilización superficial	28
Sembrado de las raíces en gotas de Gel-Gro®.	28
Clasificación de morfotipos	29

Identificación

Morfológica	29
Molecular	29
Extracción de ADN genómico	30
Secuenciación de ADN genómico	30
Purificación de los productos de PCR	31

Análisis filogenéticos	31
-------------------------------	----

Análisis estadísticos

Colonización	31
Correlación	31
Aislamiento	32
Diversidad	32

Resultados 33

Cuantificación de la colonización por hongos DSE y hongos MA en raíces de <i>B. auleticus</i>	33
Correlación de las variables estudiadas en <i>B.auleticus</i>	36
Aislamiento de hongos endofitos	36
Análisis de aislamiento	38
Clasificación de hongos DSE en morfotipos	38
Identificación	40
Morfológica	40
Molecular	42
Análisis filogenéticos	42
Análisis ecológicos	44

Discusión 45**Conclusiones** 51**Referencia bibliográfica** 52**Anexo** 67

ABREVIATURAS

DSE: Dark Septate Endophytes

MA: micorrícico arbusculares

E+: con endofito

E-: sin endofito

HSE: hifas septadas hialinas

HM: hifas micorrícicas

A: arbúsculos

C: Coils

M: microesclerocios

MT: micorrización total

AEM: Agar Extracto Malta

CEM: Caldo Extracto de Malta

PDA: Papa Dextrosa Agar

N: Nitrógeno

P: Fósforo

C: Carbono

F: *Fusarium*

B: Morfotipos de cultivos blancos

AT: Aislamientos totales

CZ: Colonización

AS: Aislamiento

Aislamiento e identificación de endofitos septados asociados a las raíces de *Bromus auleticus* en simbiosis con endofitos de vástago *Epichloë*

RESUMEN

Las plantas pueden establecer de manera simultánea múltiples asociaciones simbióticas con diferentes microorganismos; entre ellos los hongos endofitos, en los que se centra esta tesina. El objetivo general fue estudiar la asociación a campo entre la gramínea nativa perenne *Bromus auleticus* asociada o no al endofito foliar *Epichloë*, con los endofitos radiculares DSE (*dark septate endophytes*) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA).

Se evaluó el porcentaje de colonización de hongos DSE y hongos MA teniendo en cuenta el estatus de las plantas infectadas con *Epichloë* (E+) y no infectadas (E-). Se aislaron hongos endofitos a partir de las raíces de *B. auleticus*. Se realizó una clasificación en morfotipos a partir de las características cualitativas de las colonias. También se llevó a cabo la identificación morfológica y molecular de los potenciales DSE.

Para la colonización de hongos DSE y micorrización total no se observaron diferencias significativas, debido al estatus endofítico, además se registró una correlación negativa significativa entre micorrización total y colonización por DSE. Sin embargo, se observó un mayor grado de colonización para arbusculos en las plantas E+. En relación a los aislamientos, se obtuvieron un total de 82, de los cuales 48 eran posibles hongos DSE. Fueron identificados 7 organismos, tanto morfológica como molecularmente; y se obtuvieron 34 morfotipos. Los hongos aislados corresponden a los géneros *Cylindrocarpon*, *Drechslera*, *Microdochium* y *Phoma*. También se identificaron a nivel de especie *Cylindrocarpon destructans* y *Fusarium oxysporum*. Los géneros *Drechslera* y *Phoma*, fueron exclusivos de plantas E-, mientras que *Cylindrocarpon destructans* y *Microdochium*, exclusivos de plantas E+. *Fusarium oxysporum* se aisló de ambas plantas. La abundancia y diversidad de las comunidades asociadas fue mayor en plantas E+, respecto a las E-.

Los resultados obtenidos sugieren que no habría una asociación directa entre la infección con *Epichloë* y el porcentaje de colonización por DSE. El mayor porcentaje de arbusculos observado en las plantas E+ podría ser el reflejo de una mayor actividad por parte de los HMA en dichas plantas. Por otro lado, la correlación negativa entre DSE y HMA podría evidenciar una competencia entre estos dos simbiosistas de raíz. Se necesitan más estudios para determinar la naturaleza de esta

competencia. Si bien no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de colonización por DSE entre plantas E+ y E-, se obtuvo un mayor número de aislamientos a partir de las E+ y también se observaron diferencias en las comunidades aisladas de ambos tipos de plantas. Esto podría indicar que la asociación con *Epichloë* modula de alguna manera la comunidad de hongos DSE que se asocia a las raíces de su hospedante.

Los resultados obtenidos en esta tesina, reflejan la complejidad que presentan los estudios en interacciones múltiples. Los hongos endofitos aislados presentan diferentes respuestas dependiendo del hospedante, y entorno, por lo que es necesario realizar ensayos que reflejen el comportamiento de la asociación planta-hongo.

INTRODUCCIÓN

Asociación planta-hongo

Se conoce como simbiosis a la íntima relación que establecen organismos de dos especies diferentes. Este tipo de asociación se establece entre las plantas y microorganismos (Bacon y White 2000), pudiendo encontrarse dentro de un rango desde mutualistas hasta patogénicas (Smith y Read 1997; Johnson et al. 1997; Jumpponen 2001; Barrow 2003). En la simbiosis mutualista, el microorganismo simbiote se beneficia al obtener compuestos carbonados del hospedante, quien a su vez obtiene un incremento en la disponibilidad de nutrientes, así como mejoras en el crecimiento. Las asociaciones mutualistas son comunes en la naturaleza y los organismos suelen estar involucrados en más de una interacción en forma simultánea (Omacini et al. 2001). Un ejemplo de interacción multitrófica, se establece entre gramíneas, hongos endofitos foliares, hongos endofitos radicales y hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Endofitos

El término endofito es una definición funcional, que hace referencia a aquellos microorganismos que colonizan inter y/o intracelularmente tejido vegetal sano, en cualquiera de sus órganos, persistiendo por todo o parte del ciclo de vida de la planta, sin causarle síntomas de enfermedad (Wilson 1995). Rodríguez et al. (2009) proponen la agrupación de los endofitos fúngicos en 4 clases, basándose en el patrón de colonización, mecanismo de transmisión entre generaciones, grado de biodiversidad, especificidad del tejido colonizado y roles ecológicos (**Tabla 1**).

Tabla 1. Caracterización de endofitos fúngicos según Rodríguez et al. (2009). No adaptados al hábitat (NAH), hace referencia a beneficios como tolerancia a la sequía, incrementos en el crecimiento de la planta y producción de compuestos tóxicos que disminuyen la herbivoría. Adaptados al hábitat (AH) beneficios que producen tolerancia al estrés abiótico (pH, temperatura y salinidad) como resultado de presiones selectivas del hábitat.

Criterio	Clavicipitaceos	NO Clavicipitaceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospedante	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Vástago y rizoma	Vástago, raíz y rizoma	Vástago	Raíz
Colonización <i>in planta</i>	Sistémica	Sistémica	Limitada	Sistémica
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Beneficios	NAH	NAH y AH	NAH	NAH

Endofitos de pastos

Los endofitos de pastos son un grupo particular de endofitos conformado por las especies del género *Epichloë* (Clavicipitaceae, Hypocreales, Ascomycota). Estos establecen una simbiosis mutualista con gramíneas C3 de la subfamilia Pooideae, típicas de estaciones frías (Iannone 2011), colonizando el tejido aéreo del hospedante y transmitiéndose verticalmente a través de las semillas. Este grupo es monofilético y es considerado como Clase 1 según la clasificación de Rodríguez et al. (2009) (Tabla 1).

Ciclo de vida.

Los endofitos de pastos crecen de manera asintomática en el parénquima del tejido aéreo de la planta hospedante. Las especies asexuales del género, colonizan el ovario de las flores en desarrollo permaneciendo en la semilla junto con la cual son diseminadas y son transmitidas a las plantas hijas, en lo que se conoce como transmisión vertical (Schardl et al. 2004). Las especies asexuales no suprimen la reproducción de su hospedante, sino que colonizan el ovario sin alterar el desarrollo de la semilla, permaneciendo generalmente asociados a la capa de aleurona. De esta manera, el endofito obtiene como ventaja de la interacción, una forma de dispersión, protección del medio y

suministro de hidratos de carbono (**Figura 1**). En contraste, las especies del género *Epichloë* que presentan fase sexual, producen un estroma con peritecios en estructuras reproductivas, evitando el desarrollo de flores y causando esterilidad parcial o total en las plantas hospedantes. Las ascosporas producidas en los peritecios son descargadas con fuerza y son las responsables de nuevas infecciones, en lo que se conoce como transmisión horizontal (Schardl et al. 2004).

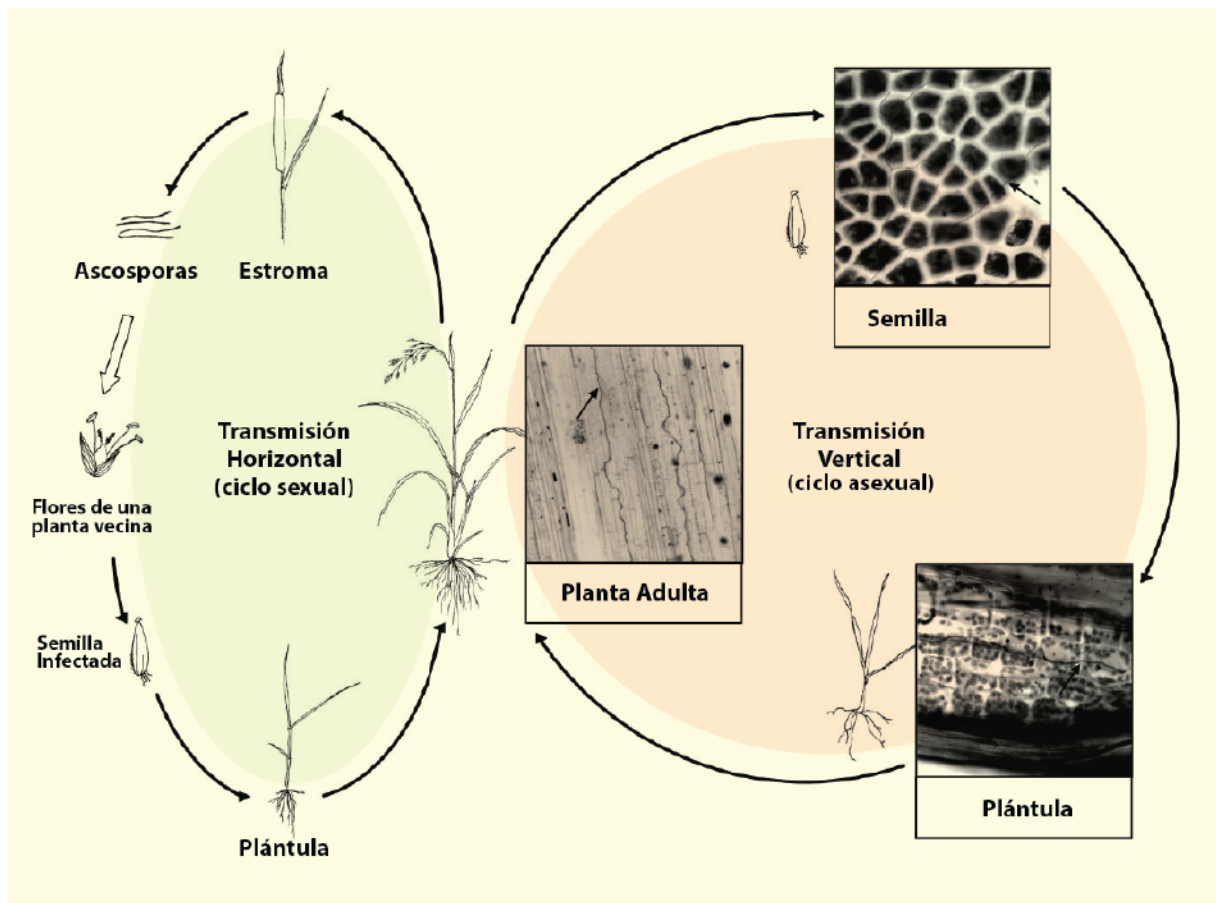


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. Modificado de Afkhami y Rudgers (2008)

Distribución y estudios de *Epichloë* en Argentina.

La mayoría de los estudios realizados sobre los endofitos *Epichloë* se centran en Europa y Norte América (Leuchtmann 1992; Saikkonen et al. 2000). En los últimos años se reportaron algunos estudios en Asia (Li et al. 2004; Wei et al. 2006), mientras que en África y América del Sur los estudios son escasos. En América del Sur, la mayoría de los estudios se concentran en la Argentina, donde se han registrado al menos 38 especies de gramíneas nativas infectadas por *Epichloë* (**Figura 2**). Las especies de gramíneas han sido identificadas dentro de los géneros: *Briza*, *Bromus*, *Festuca*, *Melica*, *Phelum* y *Poa* (Iannone et al. 2011), siendo las especies más recientemente detectadas *Hordeum comosum* (Gundel et al. 2010) y *Poa calchaquiensis* (Iannone et al. 2012b).

Si bien el ciclo de vida de *Epichloë* consta de un estadio asexual y otro sexual, en los estudios realizados en Argentina no se encontraron evidencias del estadio sexual del endofito (Iannone et al. 2011).

En diversos trabajos sobre la incidencia de los endofitos en poblaciones naturales se determinó que la distribución de las mismas está asociada a las condiciones climáticas (Iannone et al. 2011). Un ejemplo de ello son las poblaciones de *Bromus setifolius* y *Phelum alpinum* en la Patagonia Argentina, que presentan una asociación positiva y negativa respectivamente, dependiendo del nivel de lluvia (Novas et al. 2007).

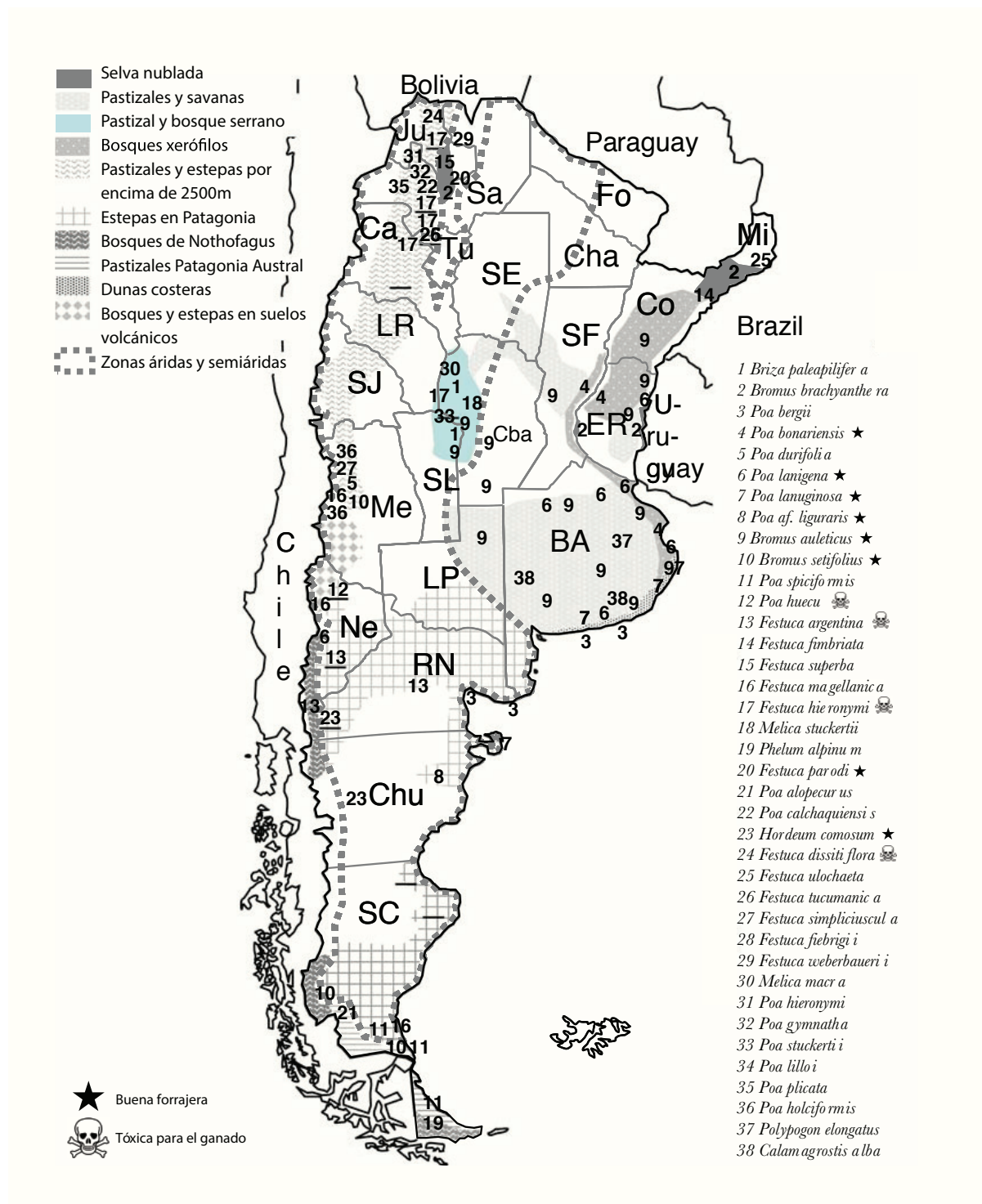


Figura 2. Distribución de los hospedantes asociados a *Epichloë* en Argentina. Modificado de Iannone et al (2011).

Efectos de *Epichloë* sobre el hospedante

El hongo puede proporcionar varios beneficios al hospedante, entre los que se pueden mencionar:

Promoción del crecimiento, reproducción y rebrote. Promueven el crecimiento vegetativo de las plantas (Schardl 2004; Malinowski y Belesky 2006; Iannone y Cabral 2006), aumentan el porcentaje y velocidad de la emergencia (Iannone y Cabral 2006), así como también la producción de semillas (Gundel et al. 2011).

Resistencia a factores bióticos y abióticos. Uno de los beneficios más importantes que puede obtener la planta, aunque negativo desde el punto de vista agronómico, es la protección contra la herbivoría. Estos simbiontes producen diferentes tipos de alcaloides, como alcaloides del ergot y lolitremos que afectan principalmente al ganado por su toxicidad (Schardl et al. 2007; Iannone et al. 2012), pero también pueden producir lolinas y peraminas que resultan tóxicas contra insectos. Por otro lado, *Epichloë*, puede ofrecer al hospedante, resistencia a la sequía (Iannone y Cabral 2006).

Cambios en el entorno del hospedante. Si bien los metabolitos de origen fúngico, son producidos en el interior de la planta, existen evidencias que indican que son excretados a través de las raíces a la rizósfera (Huang et al. 2014) y se dispersan en el suelo circundante, afectando la microflora, la microfauna o comunidades microbianas del suelo (Omacini et al. 2004; Casas et al. 2011).

Endofitos septados oscuros (DSE)

Otros hongos endofitos, son aquellos que colonizan las raíces de la mayoría de las plantas vasculares, mediante hifas septadas que se desarrollan asintóticamente. En particular, aquellos con hifas melanizadas y paredes gruesas, conocidos como endofitos septados oscuros (DSE, *dark septate endophytes*), constituyen un grupo heterogéneo cuyo grado de asociación con la planta hospedante resulta poco conocido (Newsham 2011; Mandyam y Jumpponen 2015). Estos hongos se caracterizan por presentar hifas y estructuras melanizadas como microesclerocios y clamidosporas que se observan al microscopio óptico. El estudio sobre la diversidad y rol ecológico de los hongos DSE es muy escaso, lo que podría deberse a criterios muy amplios y ambiguos para su clasificación (Rodríguez et al. 2009). Debido a la ausencia de estructuras reproductivas en la mayoría de los medios de cultivos, la clasificación en base a caracteres morfológicos es difícil (Jumpponen y Trappe 1998; Sieber 2007), por lo que se apela al empleo de técnicas moleculares (Grunig y Sieber 2006; Walker et al. 2011; Knapp et al. 2012). Éstas han permitido establecer tanto su origen polifilético como el hecho de que la mayoría pertenecen al Phylum Ascomycota (Vandenkoornhuyse et al. 2002). La mayoría de los hongos DSE identificados hasta el momento están incluidos en los órdenes: Capnodiales, Chaetosphaeriales, Chaetothyriales, Helotiales, Leotiales, Pezizales,

Pleosporales y Sordariales (Jumpponen 2001; Newsham 2011; Knapp et al. 2012).

Otra herramienta para la caracterización de los hongos DSE, es la clasificación a partir de morfotipos. Estas agrupaciones presentan una alta correlación entre las secuencias de ADN de los aislamientos incluidos en un mismo morfotipo (Lacap et al. 2003). La clasificación de Rodríguez et al. (2009) antes mencionada, describe a los hongos DSE como endofitos no clavicipitaceos, pertenecientes a la clase 4. Por lo tanto los considera un grupo funcional con estrategia de vida endofítica y la presencia de hifas septadas oscuras con colonización sistémica, que se restringen a las raíces de las plantas. De acuerdo a esta clasificación poseen un rango de hospedantes amplio y transmisión horizontal con dispersión mediante conidios y fragmentación de micelio (**Tabla 1**).

Distribución y estudios de DSE en Argentina

La distribución de estos hongos es mundial, desde regiones templadas, subtropicales hasta las regiones antárticas y árticas (Mandyam y Jumpponen 2005). Se han detectado en una gran variedad de plantas, cerca de 600 especies que representan alrededor de 320 géneros y 114 familias, incluyendo entre éstas, especies reconocidas por establecer micorrizas ericoides, orquídeoides y ecto- y endo-micorrizas, particularmente micorrizas arbusculares y están presentes, inclusive, en familias que no suelen formar asociaciones simbióticas (Jumpponen y Trappe 1998; Mandyam y Jumpponen 2005). El amplio rango de hospedantes junto con el hecho de que se han observado en familias de plantas con estrategias de vida muy diferentes, sugiere poca o ninguna especificidad en la interacción (Jumpponen y Trappe 1998). Se han encontrado particularmente en condiciones extremas como ambientes áridos y alpinos (Kovács y Szigetvén 2002; Barrow 2003), salinos a ácidos (Zhao et al. 2015) y en suelos contaminados por metales pesados (Regvar et al. 2010; Zhang et al. 2013; Wang et al. 2015; Xu et al. 2016). Muchos autores han considerado que la presencia de melanina les confiere diversos beneficios que les permiten vivir en ambientes diversos (Li et al. 2011; Ban et al. 2012).

En Argentina, los hongos DSE se han encontrado en más de 48 familias de plantas de diversos hábitats de las provincias de Córdoba (Menoyo et al. 2007; Fracchia et al. 2009), Tucumán (Albornoz et al. 2014; Lizarraga et al. 2015), Buenos Aires (Rothen et al. 2017), sitios salinos de Salta y Jujuy (Cofré et al. 2012) y bosques patagónicos (Fernández et al. 2008; 2010; Salgado Salomón et al. 2013). En muchos de dichos estudios han observado que co-existen con los hongos MA en las raíces de las plantas. La mayoría de los trabajos realizados en nuestro país, se han centrado en la observación y cuantificación de la abundancia en las raíces de distintos hospedantes naturales, incluyendo en sus análisis a los hongos micorrízico-arbusculares (MA). Nuestro grupo de trabajo ha comenzado con el aislamiento de cepas autóctonas (Cisneros 2011; Rothen et al. 2017) y se han realizado estudios in vitro de la interacción de una cepa de hongo DSE con hongos MA (*Rhizophagus intraradices*) co-inoculando en hospedantes como *Triticum aestivum*, *Glycine max* y *Solanum lycopersicum*, los resultados mostraron que los exudados del hongo DSE, identificado como *Drechslera* sp., tuvieron efectos promotores sobre el desarrollo de la simbiosis en tomate, favoreciendo el establecimiento de la micorrización, mientras que no mostraron efecto sobre los

diferentes parámetros de crecimiento de las plantas (Navarro 2008). Cuando esta misma cepa se co-inoculó con *R.intraradices* en plantas de *Hordeum vulgare*, *Lolium perenne* y *Triticum aestivum*, en algunos casos la presencia del hongo DSE, redujo la colonización del hongo MA (Lo 2013) por lo que podría existir algún tipo de competencia entre ambos en ciertas condiciones.

Proceso de colonización. Se cree que los hongos endofitos de raíz interactúan con las células del hospedante de varias maneras, dependiendo de las especies de plantas y del ambiente en el cual ocurre la colonización (Peterson et al. 2008). La mayoría de los estudios estructurales de hongos DSE se han realizado con dos especies, *Phialocephala fortinii*, debido a su amplia distribución geográfica, presencia en varios ecosistemas y amplia gama de hospedantes (Mandyam y Jumpponen 2005; Peterson et al. 2008) y *Heteroconium chaetospira*, cuya interacción ha sido estudiada en forma exhaustiva (Usuki y Narisawa 2007). Se ha observado que la colonización aparece frecuentemente en los sectores más diferenciados de las raíces, sugiriendo que los hongos DSE reciclan los nutrientes de la zona senescente o de células muertas de las raíces y los devuelven a las zonas activas (Jumpponen y Trappe 1998). También se ha observado en cultivos in vitro que el endofito *P. fortinii* coloniza el meristema apical, en plántulas de *Rhododendron brachyarpum*, y luego emerge en las raíces laterales (Peterson et al. 2008).

El proceso de colonización se caracteriza por dos fases, una extrarradical y otra intrarradical, que presenta estructuras típicas de este grupo de hongos endofitos.

Fase extrarradical. La colonización de *P. fortinii* se caracteriza por la presencia de hifas superficiales, que se conocen como “runner hyphae”. Se ha observado en distintos hospedantes, que el micelio superficial presenta hifas hialinas (Haselwandter y Read 1982; Newsham 1999; Väre et al. 1992), indicando que los hongos DSE son polimórficos y producen tanto hifas melanizadas como hialinas (Barrow y Aaltonen 2001). Las hifas superficiales entran en contacto con la raíz, y sobre las células epidérmicas y particularmente en los pelos radiculares, forman coils (C) y penetran la pared tangencial externa de las células epidérmicas sin dañar la pared celular, lo que sugiere un proceso enzimático localizado (Yu et al. 2001a; Peterson et al. 2008) (**Figura 3**). En un trabajo realizado con *Heteroconium chaetospira* se describió la formación de apresorios, sin aparente degradación de la pared (Yonezawa et al. 2004).

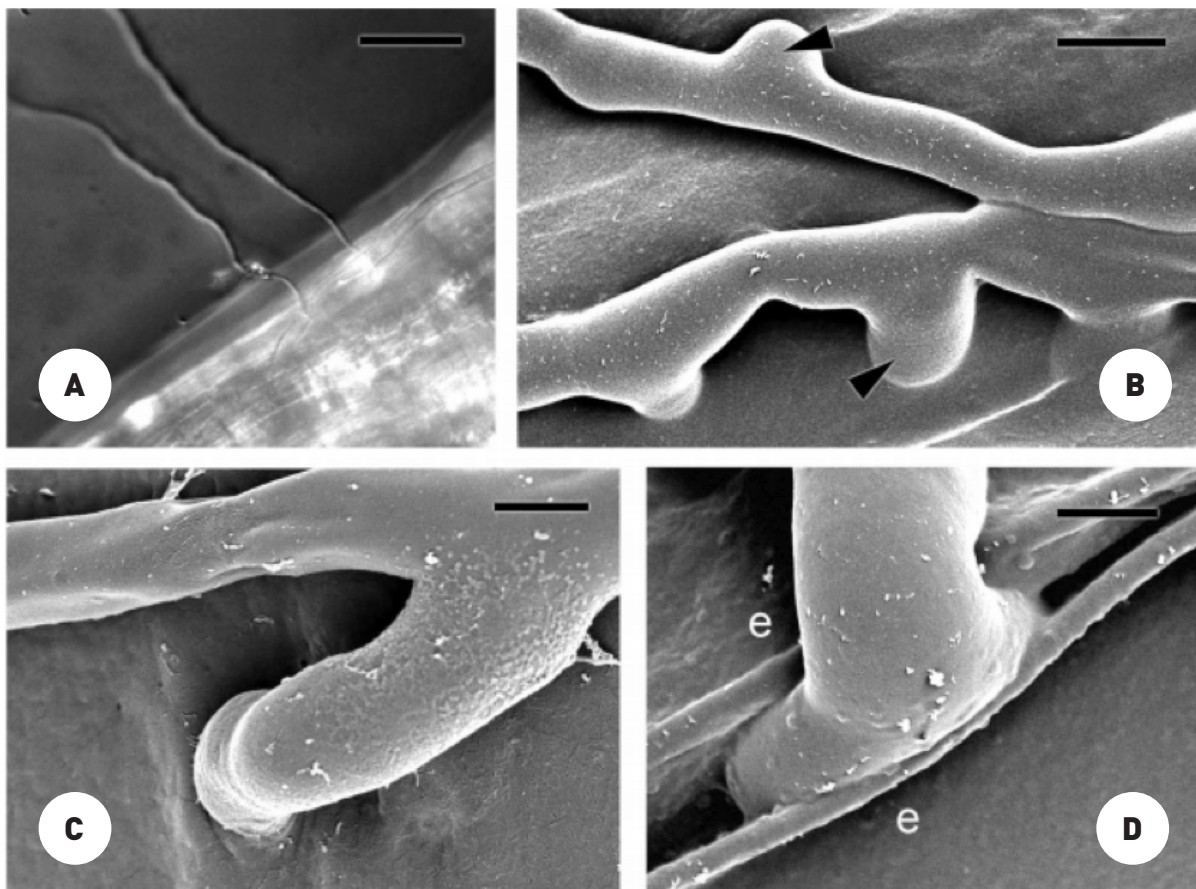


Figura 3. A- Raíz de *Phragmites australis* colonizada por el endofito *Stagonospora* sp. (in vitro) Bar 20 µm. B- Hifas del endofito, creciendo a lo largo de las paredes anticlinales de las células epidérmicas. Las flechas muestran hifopodios. Bar 20 µm. C- Hifa penetrando la epidermis, sin signos de degradación de la cutícula. Bar 1 µm. D- Ejemplo de penetración intercelular como resultado de una hifa empujando células epidérmicas (e). Bar 1 µm. Microscopía electrónica de barrido (de Gao y Mendgen 2006)

Fase intrarradical. Una vez en la capa epidérmica, las hifas pueden crecer paralelas al eje principal de la raíz del hospedante y de célula a célula dentro de la epidermis. Aunque no está descrito en forma exhaustiva, se ha observado que las hifas pasan desde las células epidérmicas a las células de la corteza mediante estrechamientos de las hifas que ocasionalmente dan origen a estructuras hinchadas que los autores describieron como apresorios (Currah et al. 1993; Yonezawa et al. 2004). Diversos estudios han mostrado que las hifas pueden estar rodeadas de material fibrilar de naturaleza desconocida, pero en ningún caso se observó una membrana perifúngica (Yu et al. 2001a; Yonezawa et al. 2004). Durante la colonización intrarradical las hifas pueden formar grupos de células con paredes celulares gruesas y melanizadas dentro de las células corticales, que se conocen como **microesclerocios** (Jumpponen y Trape 1998) (**Figura 4**). No siempre se ha descrito su función ni la naturaleza de las sustancias que acumulan. En ciertos casos como en *P. forti-*

nii se ha descrito la presencia de polisacáridos, proteínas y polifosfatos (Yu et al. 2001a). Una hipótesis sobre su función es que permiten que el hongo sobreviva en las raíces más antiguas del suelo y actúe como propágulo (Yu et al. 2001b; Peterson et al. 2008). Otra estructura típica que se observa en la colonización de raíces por DSE, son las **clamidosporas**: esporas de paredes gruesas, que les permiten sobrevivir en condiciones desfavorables.

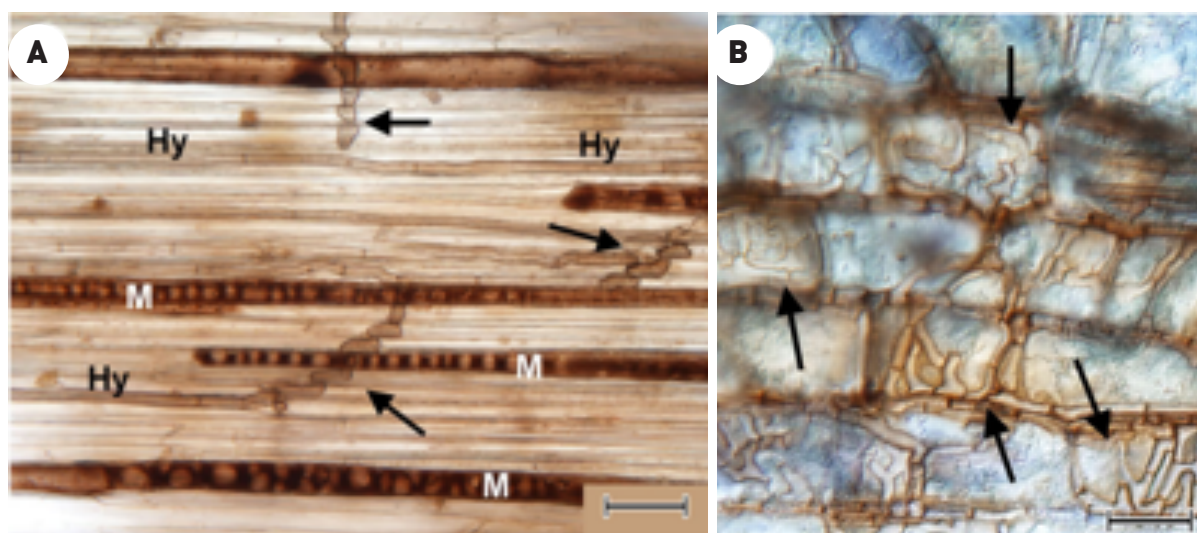


Figura 4. Estructuras características de un endofito septado oscuro: **A-** Microesclerocios (M) e hifas septadas (Hy) melanizadas o hialinas . Las flechas corresponden a hifas explorando la raíz. **B-** Detalle de hifas (flechas). Ambas imágenes corresponden a la hipodermis radicular de *Posidonia oceanica*. Bar 20 μ m. Microscopía de Contraste Interdiferencial (de Vohnik et al. 2015)

Efectos de DSE sobre el hospedante. En el estudio de las funciones de hongos DSE, hacer generalizaciones es complicado, debido a su diversidad taxonómica (Addy et al. 2005). Sin embargo, trabajos realizados en algunos géneros de DSE sugieren efectos que se mencionan a continuación, en algunos casos evidenciando roles contradictorios.

Promoción del crecimiento, reproducción y rebrote. Pocos trabajos se han realizado en nuestro país. Incrementos en la biomasa, en el número de frutos y adelantamiento en la floración fueron observados en soja y trigo al inocular una cepa de hongo DSE nativa (Navarro 2008; Lo et al. 2014). Muchos trabajos han empleado cepas originarias del hemisferio norte, particularmente distintos aislamientos de *P. fortinii*, con efectos promotores del crecimiento y utilización del N y el P (Haselwandter y Read 1982; Jumpponen et al. 1998; Newsham 1999; Upson et al. 2009; Surono y Narisawa 2017)

Mejoramiento en la absorción de nutrientes minerales, nutrientes orgánicos y agua. Muchos de los efectos sobre el crecimiento han sido atribuidos al hecho de que los hongos DSE facilitarían la absorción de nutrientes y agua, especialmente en ambientes desfavorables para el hospedante (Jumpponen y Trappe 1998; Mandyam y Jumpponen 2015). Es probable que la colonización por hifas permita el acceso a fuentes de nutrientes solubles e insolubles, que no estarían disponibles para el hospedante (Mandyam y Jumpponen 2005). Diversos trabajos han demostrado incrementos en la biomasa y en los contenidos de N y P (Haselwandler y Read 1982; Upson et al. 2009; Mandyam et al. 2010). Una propiedad que se ha relacionado con estos efectos es la capacidad de los hongos DSE para producir diversas enzimas hidrolíticas, a través de cuya actividad pueden acceder a fuentes de C, N y P, que luego podrían facilitarlas a la planta hospedante (Caldwell y Jumpponen 2003, Mandyam y Jumpponen 2005; Newsham 2011). La utilización de fuentes de N orgánico, ha sido una de las más analizadas. Un ejemplo lo constituyen el empleo de guanina y ácido úrico, productos de excreción de ácaros y otros invertebrados del suelo, como única fuente de N en cultivo puro (Caldwell y Jumpponen 2003). Distintas especies también fueron capaces de promover el crecimiento de las plantas mediante el aprovechamiento de fuentes de N orgánico (Usuki y Narisawa 2007; Upson et al. 2009; Mahmoud y Narisawa 2013). Sin embargo, en otros casos, se observó que ciertas especies, como *Helminthosporium velutinum*, *Leptodontidium orchidicola*, *Pseudocercospora abelmoschi* y *Pseudosigmoidea* sp., son incapaces de promover el crecimiento del hospedante utilizando una fuente de N orgánica (Diene y Narisawa 2009).

Se han reportado actividades enzimáticas como amilasa, celulasa, pectinasa, lipasa, proteasa, xilanasa y polifenol oxidasa (Mandyam y Jumpponen 2005, Mandyam et al. 2010; Surono y Nariwasa 2017). Estudios in vitro realizados en organismos pertenecientes a los géneros *Microdochium* y *Periconia* mostraron que estos endofitos son capaces de hidrolizar almidón, celulosa y metabolizar sustancias complejas, sugiriendo que efectivamente poseen gran capacidad como saprobios (Mandyam et al. 2010).

Resistencia a factores bióticos y abióticos. Se han observado efectos de protección tanto frente a fitopatógenos como a herbívoros (Mandyam y Jumpponen 2005). Dicha actividad ha sido atribuida a los efectos sobre el estado general de la planta, particularmente sobre la absorción de agua y nutrientes y efectos sobre la fotosíntesis (Diene y Narisawa 2009; Mandyam y Jumpponen 2015), a la producción de metabolitos bioactivos (Bartholdy et al. 2001; Tellenbach et al. 2013) y la inducción de respuestas de defensa (Tellenbach y Sieber 2012). Algunos ejemplos de este efecto son el caso de la enfermedad hernia de las coles “clubroot”, causada por *Plasmodiophora brassicae*, en las plantas pertenecientes a la familia de las Brassicaceae (Lahlali et al. 2014) y verticilosis causadas por *Verticillium dahliae* en *Brassica campestris* (Narisawa et al. 2000). Aquellas plantas tratadas con *Hete-*

roconium chaetospira mostraron mayor resistencia, aumentando la síntesis de hormonas involucradas en la defensa, tales como ácido jasmónico, etileno y auxina (Lahlali et al. 2014).

Los hongos DSE también serían capaces de aumentar la tolerancia en ambientes con metales pesados. La colonización de *Exophiala pisciphila* en *Zea mays* disminuyó los efectos nocivos de los metales pesados, promoviendo el crecimiento de raíz y vástago y restringiendo la translocación de iones de las raíces a los brotes (Li et al. 2011).

Hongos micorrícicos arbusculares

La asociación de los hongos MA con las raíces de la mayoría de las angiospermas, se considera una simbiosis mutualista, que favorece al hospedante, incrementando la absorción de nutrientes inorgánicos desde el suelo, particularmente fósforo (P) y nitrógeno (N) (Smith y Read 2008). También están involucrados en la tolerancia a la sequía, protección ante patógenos de raíz (Smith y Read 1997), mejoramiento en la absorción de agua (Marulanda et al. 2003), la tasa de fotosíntesis (Black et al. 2000) y el metabolismo de carbohidratos del hospedante (Smith y Read 1997). Los hongos MA obtienen carbohidratos de las plantas, se calcula que hasta el 20% de los productos de fotosíntesis de las plantas terrestres son consumidos por estos hongos (Bago et al. 2000; Parniske 2008).

Una clasificación reciente, ha incluido a los hongos MA, en el Phylum Mucoromycota, comprendido por los subphylum Glomeromycotina, Mortierellomycotina y Mucoromycotina (Spatafora et al. 2017). Glomeromycotina, es el subphylum que agrupa a los hongos MA, formado por cuatro órdenes Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales y Paraglomerales. Los hongos MA se asocian con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres, aproximadamente entre un 70% y 90% de familias de plantas (Smith y Read 2008).

Proceso de colonización. Se distinguen dos fases en la colonización, una extrarradical y otra intrarradical con estructuras características

Fase extrarradical. Las hifas de los hongos MA son cenocíticas y se ramifican, explorando el suelo en busca de P, N y micronutrientes que luego son transferidos a la planta hospedante (Finlay 2008).

Fase Intrarradical. La colonización primaria se lleva a cabo luego del reconocimiento de la planta, las hifas entran en contacto con la raíz y forman un apresorio, que se desarrolla a partir de la hifa madura. Las células de las plantas desarrollan un aparato de pre-penetración que guía a las hifas hasta las células de la corteza donde se desarrollan las estructuras típicas de los hongos MA (Parniske 2008). Se reconocen tres estructuras:

1) los **arbúsculos**: su formación se desencadena cuando una hifa intercelular penetra las paredes de la célula vegetal sin romper la membrana plasmática, la cual se invagina y crece

acompañando el desarrollo de esta estructura. De esta manera, el hongo nunca penetra dentro del citoplasma y restringe su crecimiento al apoplasto de las células del parénquima cortical (**Figura 5**). Son considerados esenciales para clasificar a la simbiosis micorrícica como funcional (Bécard y Piché 1989). 2) Las **vesículas**, estructuras intrarradicales con paredes gruesas que pueden tener forma variable, contienen una alta proporción de lípidos y numerosos núcleos (Smith y Read 2008). Se originan a partir del ensanchamiento de una hifa y pueden ser terminales o intercalares (Peterson et al. 2004). 3) Los **coils**, hifas enruladas intracelularmente que se dirigen de célula a célula de la corteza sin romper la membrana plasmática (**Figura 5**). Se supone que, al igual que los arbuscúlos, están involucrados en el transporte de fósforo (Smith et al. 2004).

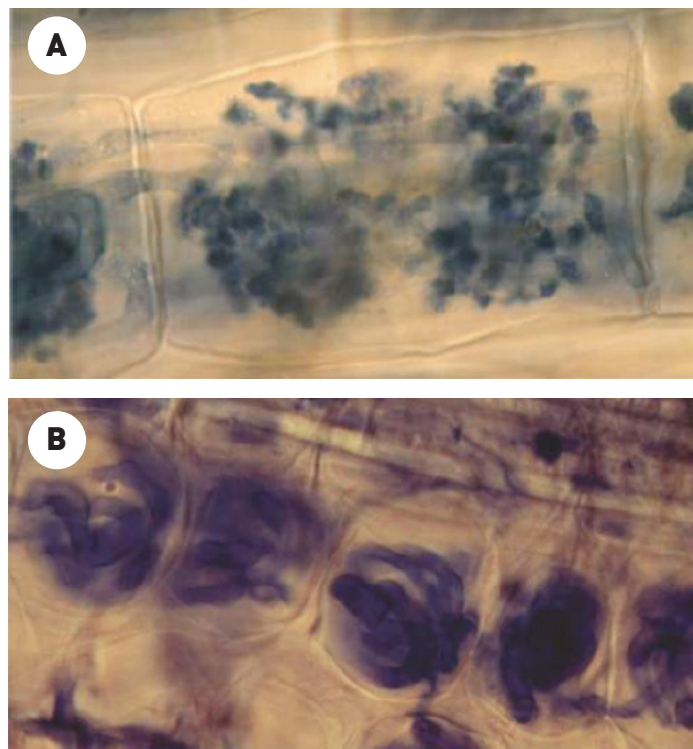


Figura 5. Raíces de *Bromus aulecticus* teñidas con Trypan blue: **A-** Foto de arbuscúlo. **B-** Foto de coils. A: 400X. De Vignale (2016)

Los hongos MA presentan numerosas morfologías de colonización entre dos tipos morfoflógicos: tipo-*Arum* que se define por el crecimiento hifal intercelular en la corteza de la raíz, y tipo-*Paris* que se caracteriza por el crecimiento hifal intracelular célula a célula (Gallaud 1905).

Interacciones multitróficas

En la naturaleza las plantas están involucradas en forma simultánea en más de una interacción con microorganismos (Larimer et al. 2010). Una clase de interacción multitrófica que ha recibido poca atención es la que se establece entre las plantas, los endofitos fúngicos foliares, y los hongos micorrícicos arbusculares (MA).

Hasta el momento, los estudios realizados en dicha interacción, han mostrado resultados contradictorios. Si bien todavía no se ha encontrado a qué factores se deben dichas diferencias, se ha observado una tendencia asociada al tipo de hospedante en estudio.

En Argentina se estudió la micorrización en 3 especies de gramíneas nativas silvestres (*Bromus auleticus*, *B. setifolius* y *Poa bonariensis*) asociadas a *Epichloë* (E+). En los tres casos, las plantas E+ mostraron una mayor frecuencia de colonización por hongos MA que en aquellas plantas libres de endofito (E-) (Novas et al. 2005, 2009; Arrieta et al. 2015; Vignale et al. 2016, 2017). Sumado a esto, los resultados mostraron que las raíces de plantas provenientes de una población E-, que coexistieron con las E+ presentaron una micorrización semejante a las E+, mientras que cuando no se encontraban en contacto con las E+, su tasa de micorrización fue significativamente menor (Novas et al. 2005, 2009). Estudios realizados in vitro mostraron que los exudados de endofitos y los exudados de las raíces de plantas infectadas por endofitos, promueven el desarrollo pre-infectivo (Novas et al. 2011) y la tasa de germinación de esporas y desarrollo del micelio extrarradical de los hongos MA (Vignale et al. 2016).

Por el contrario, en el caso de gramíneas agrónomicamente seleccionadas se ha detectado una reducción de la micorrización y esporulación cuando las plantas estaban colonizadas por endofitos *Epichloë* (Chu-Chou et al. 1992; Guo et al. 1992; Müller 2003; Omacini et al. 2006; Liu et al. 2011).

En relación con la simbiosis entre endofitos *Epichloë* y endofitos DSE, hay dos trabajos previos, que estudian esta asociación (Vandegrift et al. 2015; Slaughter 2016). Vandegrift et al. (2015) evaluaron la interacción múltiple en la gramínea *Agrostis capillaris*, en el noroeste de Estados Unidos (**Figura 6**). En dicho trabajo, estudiaron plantas asociadas al endofito foliar *Epichloë* y determinaron el porcentaje de raíz colonizada por hongos MA y hongos DSE. Trabajaron en tres sitios experimentales, en los cuales se manipularon las condiciones climáticas, hipotetizando que los simbiontes podrían competir por los recursos del hospedante y que esa competencia cambiaba con las condiciones ambientales de manera de maximizar el fitness del hospedante. Los resultados mostraron que plantas asociadas a endofitos *Epichloë* (E+) no afectaron la colonización de hongos MA u hongos DSE; sin embargo, se observó un efecto negativo en la colonización de hongos DSE cuando las plantas eran libres de endofitos (E-). La colonización por hongos DSE decrecía cuando la disponibilidad de agua para las plantas era mayor. Sin embargo los resultados fueron opuestos cuando trabajaron con la gramínea anual *Bromus hordeaceus* L., en un sitio con variación climática extrema, mayor disponibilidad de nutrientes y precipitaciones totales. En ese estudio no se

observó correlación entre hongos MA y hongos DSE, mientras que la infección por *Epichloë* modulaba la colonización por hongos DSE, siendo positiva en plantas E- (Vandegrift et al. 2015). Por lo que se postula que las interacciones múltiples, en las asociaciones planta-hongos, se basarán en la fisiología del hospedante, la disponibilidad del inóculo, la interacción de los simbiontes y los factores abióticos del entorno (Vandegrift et al. 2015).

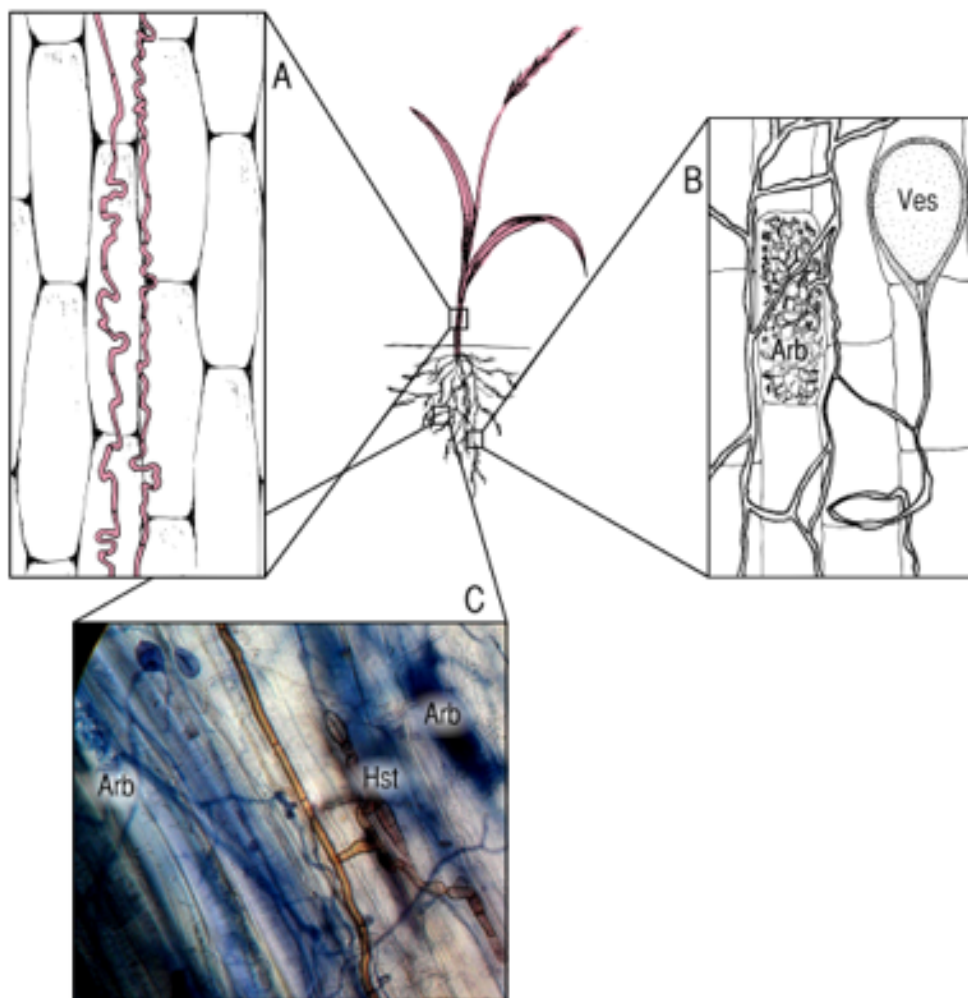


Figura 6. Localización de los simbiontes en el hospedante *Agrostis capillaris*. **A-** Endofitos del género *Epichloë* creciendo entre células. **B-** Hongos MA colonizando las raíces de sus hospedantes, formando arbuscúlos (Arb) y vesículas (Ves). **C-** Hongos DSE con hifas melanizadas y haustorio (Hst), en asociación con los hongos MA, se observan arbuscúlos (Arb). Foto (400 ×). (de Vandegrift et al. 2015)

Slaughter (2016) realizó un trabajo a campo en Lexington, Kentucky (Estados Unidos), con el fin de estudiar cómo, la presencia/ausencia del endofito *Epichloë coenophiala* y distintas combinaciones genéticas simbiotes/hospedante, afectan las interacciones planta-endofito, en la gramínea invernal *Schedonorus arundinaceus*. Al analizar la colonización de hongos MA y hongos DSE, no encontró diferencias significativas debido a *E. coenophiala*. Sin embargo, encontró que la variación genotípica de *Schedonorus arundinaceus* y la presencia de endofitos altera la capacidad funcional de los hongos MA, induciendo las estructuras de almacenamiento (vesículas) y aumentando la formación de arbuscúlos e hifas extrarradicales en el suelo. Slaughter (2016) concluye que estos cambios están asociados a las condiciones climáticas, como el aumento de la temperatura y de las precipitaciones. A diferencia de lo observado con los hongos MA, el grado de colonización por hongos DSE no presentó diferencias significativas debido a variaciones genéticas del hospedante. En cambio, observó una reducción de la simbiosis por parte de los hongos DSE, entre distintas cepas de *E. coenophiala*, tóxicas y no tóxicas y sugiere que la colonización de los endofitos radiculares podría estar relacionada con las reservas de carbono de la planta, los efectos de endofitos foliares u otros endofitos asociados. Además, observó que el aumento de temperatura, duplicó la colonización de los hongos DSE, por lo que Slaughter (2016) infiere que las comunidades fúngicas presentes en el suelo pueden sufrir cambios en su composición debido a las condiciones climáticas, tal como se observó en el trabajo de Vandegrift et al. (2015).

Forrajera *Bromus auleticus*

Bromus auleticus Trin. ex Nees (Pooideae) es una gramínea C3 perenne invernal nativa de Argentina, sur de Brasil y Uruguay. Dentro de Argentina, donde es vulgarmente denominada cebadilla chaqueña, su área de distribución abarca las provincias de La Pampa, Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, San Luis, Entre Ríos y Corrientes (Gutiérrez y Pensiero 1998; Millot 2001). Se la puede encontrar tanto en pastizales de la región pampeana como en las sierras cordobesas y puntanas, sur de la región chaqueña y en la Mesopotamia hasta la mitad sur de Corrientes. Habita en suelos arenosos o arenosos-humíferos pero en las áreas de gran explotación agroganadera es más difícil de encontrar por efecto del laboreo continuado (Gutiérrez y Pensiero 1998).

Debido a su alta productividad, palatabilidad, riqueza en proteínas, persistencia a campo y resistencia a la sequía (Moraes y Oliveira 1990; Millot 1999; Gasser et al. 2005), es una de las forrajeras más valiosas en el Cono Sur (Millot 1999; Traverso 2001; Ayala et al. 2010; Bustamante et al. 2012).

Los antecedentes mencionados muestran que es de interés estudiar el efecto de los endofitos *Epichloë* sobre la colonización y diversidad de hongos DSE asociados a las raíces, junto con la presencia de hongos MA. Esto permitirá adquirir un mejor entendimiento sobre el rol ecológico de diferentes asociaciones simbióticas en simultáneo en un mismo hospedante. A su vez *Bromus auleticus* es un buen modelo de hospedante, debido a las características que presenta, que la hacen una potencial forrajera.

HIPÓTESIS GENERALES

- La simbiosis entre plantas de *Bromus auleticus* y endofitos *Epichloë* favorece la colonización de las raíces por parte de los endofitos DSE en relación a las plantas de *B. auleticus* no asociadas a *Epichloë*.
- Las plantas de *Bromus auleticus* con diferente estatus endofítico se asocian a diferentes especies de hongos DSE.
- Existe una correlación entre la colonización simultánea de raíz por DSE y hongos MA en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë*.

OBJETIVOS

- Evaluar la asociación entre la simbiosis *Bromus auleticus*-*Epichloë tembladera* y el porcentaje de colonización de raíz por endofitos septados oscuros y hongos micorrízico-arbusculares.
- Evaluar la asociación de la simbiosis *Bromus auleticus*-*Epichloë tembladera* sobre la diversidad de hongos DSE asociados a las raíces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon plantas de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees, cultivadas a campo. En las que se determinó la colonización de hongos MA y hongos DSE. Se realizaron aislamientos de hongos DSE y se identificaron morfológica y molecularmente. Asimismo se realizaron cálculos de frecuencias e índices ecológicos.

Sitio y condiciones de muestreo

Se realizó un muestreo en el mes de Mayo de 2016, en la Estación Experimental INTA Concepción del Uruguay, ubicada en la región Sureste de la provincia de Entre Ríos (**Figura 7**). Allí se cuenta con parcelas con plantas de *Bromus auleticus* Trinius, infectadas con endofitos *Epichloë tembladerae* (E+) y libres de endofitos (E-). Las plantas E- fueron obtenidas a partir de las E+ como consecuencia de la pérdida de viabilidad del endofito en almacenamiento a 24°C durante 6 meses. De esta manera las plantas E+ y E- provienen de las mismas semillas recolectadas originalmente, minimizando así diferencias genotípicas entre las plantas con diferente estatus endofítico.

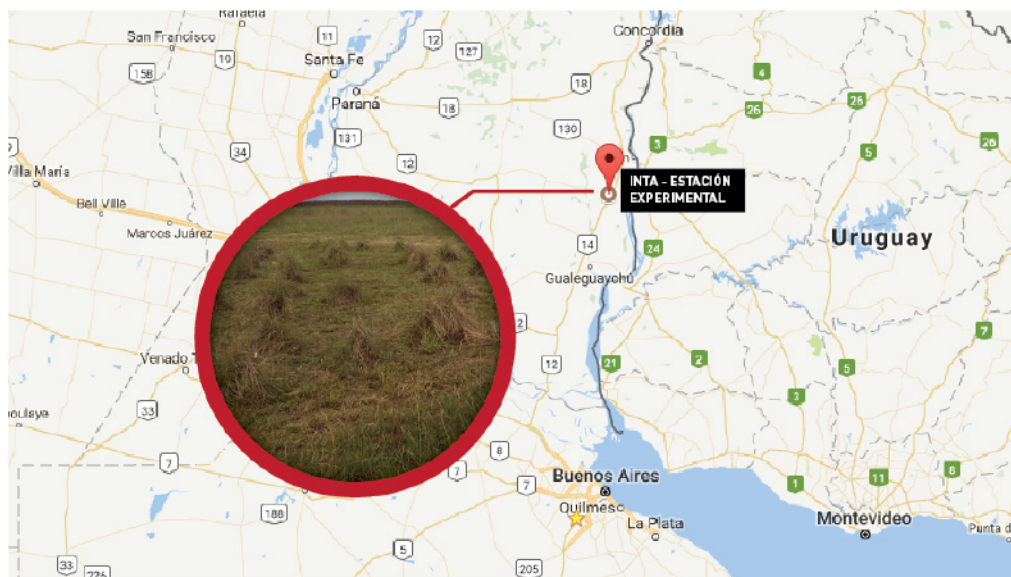


Figura 7. Imagen satelital de la ubicación geográfica de la estación experimental INTA Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina. En detalle, parcela con las plantas de *Bromus auleticus*.

Bromus auleticus es una especie caracterizada por plantas cespitosas, con rizomas breves que forman matas cuyas cañas pueden alcanzar hasta 1 m de altura. Las panojas son erectas y pueden medir hasta 20 cm de longitud. Las espiguillas son grandes (2 a 3 cm) y portan entre 6 y 9 flores (Burkart 1969).

El clima predominante de la zona de muestreo corresponde al templado húmedo de llanura, sin situaciones extremas, favorable para los cultivos. Presenta dos ambientes diferenciados, el “continental” ocupando la mayor superficie y el “predelta” en la región sur. En la zona continental predomina un paquete sedimentario pampeano, dando lugar a una peniplanicie, con suelos profundos y bien drenados (<http://inta.gob.ar>). Los suelos de la zona de muestreo son de origen continental, se los denomina Vertisoles, se caracterizan por ser muy oscuros difíciles de trabajar, con un elevado porcentaje de arcilla expansiva (<http://inta.gob.ar>).

Las condiciones climáticas en el año 2016, se caracterizaron por presentar la temperatura promedio anual (17,6 °C) muy similar a la temperatura promedio histórica (17,8 °C), mientras que el promedio anual de precipitaciones fue 1230,9 mm. En particular en el mes de mayo, la temperatura y precipitaciones medias fueron de 12,5 °C y 14,4 mm, respectivamente. Cabe destacar que el mes de Abril del 2016 presentó un record en precipitaciones (407,2 mm) (<http://inta.gob.ar>).

Las plantas son cultivadas en una parcela de 10m x 10m, y la distancia entre ellas permite identificar las raíces de los individuos muestreados. Se tomaron muestras de raíces de 8 plantas E+ y 8 plantas E-, con un barreno de 6 cm de diámetro. Junto con las muestras de suelo y raíces, de cada planta se tomó una porción de tejido aéreo para corroborar el estatus endofítico de la planta.

Las muestras recolectadas fueron embolsadas en forma individual y luego rotuladas adecuadamente para su transporte. Se mantuvieron en heladera a 4°C hasta su procesamiento, que no superó las 48 hs.

Estatus endofítico de *Bromus auleticus*

Se chequeó el estatus endofítico del tejido aéreo en cada planta de *B. auleticus*, utilizando técnicas histológicas. En las hojas de *B. auleticus* se realizó un peeling, y con bisturí se obtuvo un raspado de la zona expuesta. El tejido parenquimático obtenido se montó en un portaobjetos para su tinción con azul de anilina, luego de 5 minutos se observó al microscopio óptico (Clark et al. 1993). Como criterio se estableció que una planta es considerada infectada por endofitos *Epichloë* (E+), si se visualizan las hifas intercelulares creciendo en el parénquima cortical.

Lavado de raíces de *B. auleticus*

En el laboratorio, las muestras de raíces se lavaron con abundante agua corriente y utilizando diferentes tamices, de manera de remover el suelo adherido y obtener las raíces de *B. auleticus* limpias. El total del sistema radicular de cada planta, fue separado en dos sub-muestras, una para proceder a la tinción y cuantificación de la colonización por hongos DSE y MA y la mitad restante, para el aislamiento de hongos DSE.

Cuantificación de colonización de raíces de *B. auleticus* por hongos DSE

Para determinar el grado de colonización de las raíces por DSE, las raíces fueron teñidas con Trypan Blue siguiendo la metodología propuesta por Phillips y Hayman (1970).

Tinción de las raíces

Las raíces se clarificaron sumergiéndolas en una solución de KOH 10 % y se dejaron por una hora a 90 °C. Se enjuagaron con agua de la canilla y luego se sumergieron en una solución de HCl 0.2 N durante 3 minutos para neutralizar los restos de KOH. Posteriormente fueron sumergidas en una solución de Trypan Blue (0,02 %) por 15 minutos a 90 °C. Finalmente fueron guardadas en ácido láctico para su posterior observación al microscopio óptico (**Figura 8**).

Cuantificación de las raíces

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método propuesto por McGonigle (1990). Se cuantificaron todas las hifas septadas melanizadas o no; y microesclerocios que se observaron al microscopio en 150 campos/planta, así como también la presencia de hifas micorrícicas, arbuscúlos y coils.

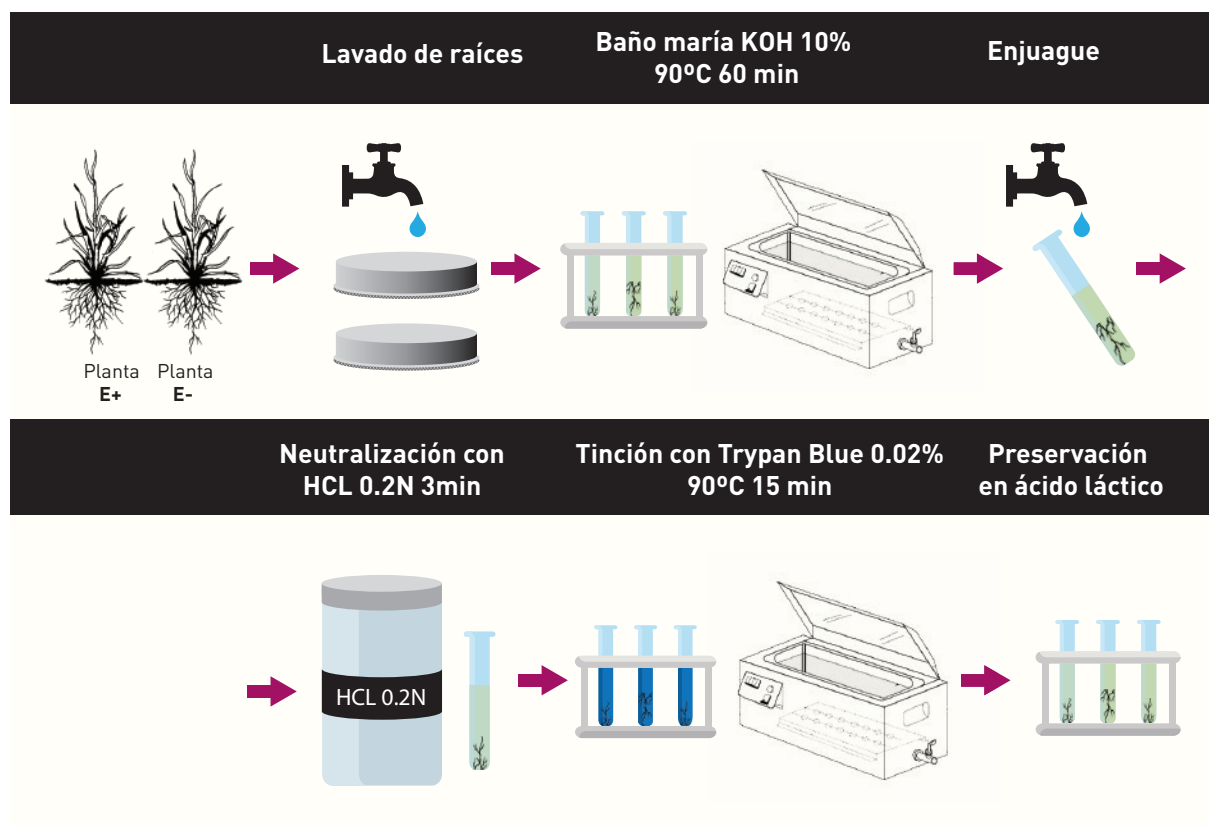


Figura 8. Esquema para tinción de hongos en raíces de *Bromus auleticus*.

Aislamiento de endofitos septados oscuros (DSE)

Esterilización superficial

Una vez obtenidas las raíces correspondientes a cada planta, se llevó a cabo la esterilización superficial, lavando con agua destilada estéril y agitación durante 30 segundos, seguido de una solución de NaOCl 10% durante 5 minutos y una solución de antibióticos (0,05% de Penicilina, 0,05% de Ampicilina, 0,05% de Estreptomicina y 0,05% de Tetraciclina) por 30 segundos. Finalmente se enjuagó con agua destilada estéril durante 30 segundos. Los tiempos de exposición se ajustaron mediante un ensayo preliminar en el cual se realizaron tres tratamientos distintos de esterilización, modificando el tiempo de exposición a la solución de NaOCl 10% siendo de 3 minutos, 5 minutos o 10 minutos. Cada 24 horas durante 3 días, se chequeó el crecimiento de hifas en cada tratamiento. Siendo el tratamiento de 5 minutos el óptimo, debido al crecimiento de hifas.

Sembrado de las raíces en gotas de Gel-Gro®. De cada una de las muestras esterilizadas se cortaron al azar, 30 fragmentos de raíces, de aproximadamente 5 mm, descartándose la zona de los extremos. Se sembraron en gotas de Gel-Gro® (0,35 % p/v y 0,03% MgSO₄, pH 6) con cloranfenicol (0.01%) en placas de Petri de 15 cm de diámetro (Silvani et al. 2008) que fueron incubadas a 25 °C (**Figura 9**). Los fragmentos se revisaron periódicamente con el fin de detectar la presencia de hifas en desarrollo a partir del interior de cada trozo de raíz. En caso de observar crecimiento de hifas, estas se transfirieron a placas de Petri de 5 cm de diámetro con agar extracto de malta (AEM) y se incubaron a 25°C. En forma periódica se controló el crecimiento de las colonias, y se realizaron los repiques necesarios para conseguir cultivos puros en caso de contaminación o presencia de más de una colonia.

Los cultivos puros se conservaron en tubos pico de flauta con AEM, a 4°C.



Figura 9. Esquema para el aislamiento de hongos a partir de raíces de *Bromus auleticus*.

Clasificación de morfotipos

En base al aspecto de las colonias y la velocidad de crecimiento de los cultivos fúngicos, los aislamientos con colonias melanizadas en cultivo, fueron agrupados en diferentes morfotipos (Lacap et al. 2003). Se sembraron dos réplicas de cada aislamiento en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con AEM. La velocidad de crecimiento se determinó midiendo el diámetro de la colonia en cm durante 30 días, se midieron dos diámetros perpendiculares por colonia. Otras características que se tuvieron en cuenta fueron el color de la colonia, anverso y reverso, de acuerdo a la tabla de color Munsell (1954), elevación (plana, cóncava o convexa), textura (algodonosa, aterciopelada, 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. A partir de características morfológicas y del desarrollo de estructuras reproductivas, tales como conidios y conidióforos, observados en los aislamientos tanto con colonias oscuras como aquellos con colonias claras en AEM, se llevó a cabo la identificación a nivel de género, utilizando bibliografía específica (Ellis 1971; Domsch et al. 1980). En el caso particular de los aislamientos del género *Fusarium*, fueron identificados a nivel de género en AEM y posteriormen-

te a especie, empleando, por un lado, agar dextrosa papa (PDA), de utilidad para observaciones cualitativas tales como el color de la colonia y por otro lado, mediante la utilización de hojas de Clavel que favorece la esporulación del hongo, de acuerdo a lo propuesto por Nelson et al. (1983). Para ello se utilizaron hojas jóvenes de clavel, las cuales se cortaron en fragmentos de 0,5 cm x 0,5 cm, se colocaron en un erlenmeyer con agua destilada, y se esterilizaron en autoclave. Luego, los fragmentos de hojas fueron colocados en cajas de Petri de 9 cm que contenían agar (15% g/L), empleándose 4 trozos por caja. Fragmentos de 5 cm de diámetro de los cultivos de *Fusarium* sp. en medio AEM, fueron tomados del borde de las colonias en activo crecimiento, y repicados en las cajas de Petri con hojas de clavel y se incubaron a 25°C.

Molecular. En aquellos casos donde no pudo llevarse a cabo la identificación morfológica, se realizó la identificación molecular.

Extracción de ADN genómico

Los hongos se cultivaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con Caldo Extracto de Malta (CEM) a 25°C en oscuridad. Una vez que el hongo creció lo suficiente, se tomó todo el micelio, con ayuda de una espátula estéril, se colocó en papel aluminio y se mantuvo en freezer. La extracción de ADN genómico a partir del micelio obtenido se realizó siguiendo el protocolo correspondiente al kit UltraClean® Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories INC., Carlsbad, CA, USA). Para corroborar si la extracción de DNA genómico resultó exitosa, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y revelado mediante GelRed™.

Amplificación de ADN genómico

En cada una de las muestras obtenidas de ADN genómico, se realizó una amplificación de la región ITS del ADNr por PCR, utilizando los primers ITS4 e ITS5 (White y col. 1990). La mezcla de reacción con 50 µl de volumen final, estuvo compuesta de 3 µl de ADN genómico, 37 µl de agua Milli-Q y 10 µl de MIX. La MIX contuvo 1 µl de 10 mM dNTP, 5 µl de 10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer con 18 mM MgCl₂, 2.5 µl de DMSO, 0.5 µl de 100 µM primers ITS4, 0.5 µl de 100 µM primers ITS5 y 0.5 µl de 5 U/µl TAQ DNA Polymerase FastStart High Fidelity Enzyme Blend (ROCHE).

Antes de la reacción de amplificación se procedió a someter el ADN genómico en agua Milli-Q a un ciclo de desnaturalización a 98 °C por 3 minutos, con el fin de evitar posibles interferencias ocasionadas por las melaninas que contienen estos hongos. Posteriormente se colocaron todos los reactivos y se procedió a la reacción de amplificación según las siguientes condiciones: 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 segundos, apareamiento a 54 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 20 segundos, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO BIO) y enviados a Corea, con los primers ITS4 e ITS5, para su secuenciación en MacroGen Inc. (Seul, South Korea).

Análisis filogenéticos

Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit 7.0 y comparadas con secuencias de la base de datos GenBank del Centro para la Información Biotecnológica (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W del Mega 6.0, y el análisis filogenético mediante el criterio de máxima parsimonia (Tamura et al. 2013). Con las secuencias proporcionadas del resultado del BLAST y las secuencias obtenidas se generó una matriz de distancias y finalmente, los nodos del respectivo árbol fueron evaluados a través de bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein 1985). Los parámetros fueron estimados con Modeltest 3.7, y los árboles fueron visualizados y editados con Tree Explorer y CorelDraw 11.

Análisis estadísticos

Colonización. Las diferencias en la colonización de raíces por hongos MA y hongos DSE, fueron evaluadas considerando como factor principal el estatus endofítico con *Epichloë* de las plantas. Las diferencias en la colonización se analizaron para cada estructura por separado (hifas septadas hialinas y melanizadas, hifas cenocíticas de hongos MA, coils y arbúsculos). Estas diferencias fueron analizadas utilizando modelos lineales generalizados, considerando que las variables presentan una distribución Binomial, que tiene en cuenta el número de éxitos en n ensayos. Cuando los datos presentaron sobredispersión se aplicó una distribución Binomial negativa. Se trabajó con el paquete lme4 del software estadístico R (R Core Team 2016). En todos los casos los supuestos de los análisis fueron chequeados.

Correlación. Para evaluar la relación entre las variables, hifas septadas melanizadas, micorrización total, coils y arbúsculos, se realizó un análisis de correlación. También se evaluó la relación entre el número de aislamientos de hongos DSE obtenidos y la colonización por parte de estos hongos, según el estatus endofítico. Para ambos casos se realizó un análisis de Correlación de Pearson, utilizando el paquete Hmisc de R (R Core Team 2016).

Aislamiento. Se realizó un análisis de los aislamientos obtenidos según el estatus endofítico de las plantas. Se trabajó con el paquete lme4 del software estadístico R (R Core Team 2016).

Diversidad. Para comparar la riqueza y abundancia de especies entre las plantas en simbiosis con *Epichloë* y las plantas libres de *Epichloë* se trabajó con los índices de Shannon-Wiener (S) y Simpson (D). El primero, tiene en cuenta la riqueza y equitatividad, dando información independientemente del tamaño de la muestra considerada (Poole 1974), el segundo índice 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:

Shannon – Wiener $S = -\sum_j (p_j \ln p_j)$

Simpson inverso $1/D = 1/\sum_j (p_j^2)$

$p_j = N^\circ \text{ de aislamientos de la especie } j / N^\circ \text{ de aislamientos totales}$

RESULTADOS

Cuantificación de la colonización por hongos DSE y hongos MA en raíces de *B. auleticus*

En todas las plantas se observaron estructuras de hongos DSE como microesclerocios e hifas septadas melanizadas; y estructuras de hongos formadores de micorrizas arbusculares (**Figura 10**) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Frecuencias observadas para cada tipo de estructura cuantificada. Hongos septados oscuros (DSE), hifas septadas hialinas (HSE), hifas micorrícicas (HM), arbusculos (A), coils (C), microesclerocios (M) para cada estatus endofítico, plantas con endofito (E+) y plantas sin endofitos (E-).

STATUS	PLANTA	DSE	HSE	HM	A	CM	M
E+	1	0,250	0,420	0,181	0,096	0,051	0
	2	0,107	0,435	0,242	0,129	0,026	0,059
	3	0,761	0,067	0,110	0,012	0	0,049
	4	0,012	0,664	0,227	0,042	0	0,054
	5	0,302	0,267	0,233	0,107	0,039	0,051
	6	0,100	0,492	0,229	0,078	0,056	0,044
	7	0,097	0,378	0,233	0,223	0,014	0,053
E-	1	0	0,019	0,694	0,286	0	0
	2	0,017	0,547	0,205	0,060	0,145	0,025
	3	0,157	0,333	0,304	0,128	0,038	0,038
	4	0,198	0,581	0,102	0,018	0,053	0,048
	5	0,532	0,411	0	0,006	0,019	0,031
	6	0,335	0,572	0,024	0,005	0,014	0,048
	7	0,175	0,598	0,111	0,015	0,063	0,037

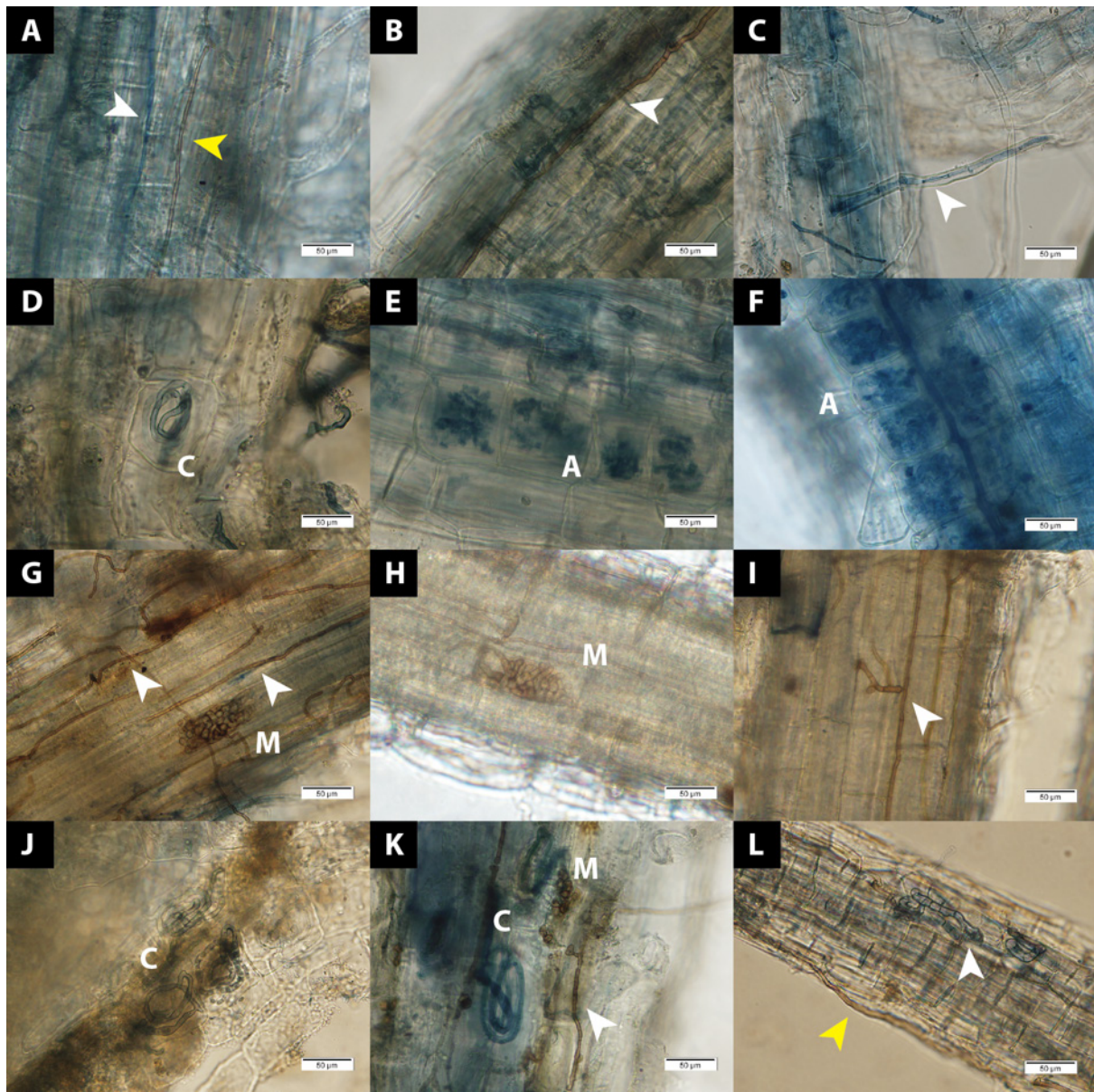


Figura 10. Imágenes correspondientes a raíces de *Bromus auleticus* teñidas con Trypan Blue. Las imágenes A, B, C y D, corresponden a raíces de plantas E+; las imágenes E, F, G, H, I, J, K y L corresponden a raíces de plantas E-. A- Hifas septadas melanizadas (flecha amarilla) y hialinas (flecha blanca). B- Hifas septadas melanizadas. C- Hifa septada hialina en un pelo radicular. D- Coil (C). E. Arbusculos (A). F- Hifa micorrícica y arbusculos (A). G- Microesclerocio (M) e hifas septadas melanizadas (flecha). H- Microesclerocio (M). I- Hifa septada melanizada (flecha). J- Coil (C). K- Coil (C), microesclerocio (M) e hifa septada melanizada (flecha). L- Hifa septada hialina (flecha blanca) y melanizada (flecha amarilla).

La simbiosis, medida como la extensión total de la colonización por hongos DSE (DSE), micorrización total (MT), arbuscúlos (A) y coils (C) fue mayor en plantas E+, sin embargo, no mostró diferencias significativas debido al estatus endofítico de *Epichloë* ($Z_{DSE}=-0.376$ $p=0.707$; $Z_{MT}=0.426$ $p=0.67$).

Al analizar la colonización micorrícica, no se observaron diferencias significativas para coils (C) ($Z_C=-0.705$ $p=0.481$) debido al estatus endofítico, las diferencias sólo fueron significativas en el caso de los arbuscúlos, siendo mayor el grado de colonización en las plantas E+ ($Z_A=3.559$ $p=0.00037$) (**Figura 11**)

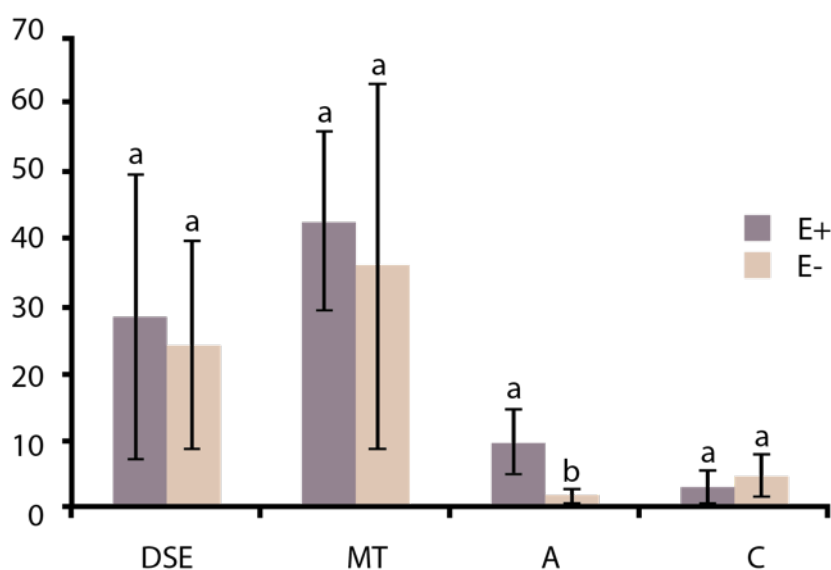


Figura 11. Porcentaje de colonización de hongos DSE, micorrización total (MT), arbuscúlos (A) y coils (C) para cada estatus endofítico. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Correlación de las variables estudiadas en *B. auleticus*

Entre las variables DSE, arbúsculos y coils, la correlación fue negativa ($P_{DSE-A} = -0.42$ $p=0.13$; $P_{DSE-C} = -0.28$ $p=0.34$; $P_{A-C} = -0.20$ $p=0.48$). Mientras que fue significativamente negativa entre micorrización total y DSE ($P_{DSE-MT} = -0.54$ $p=0.04$). Asimismo, entre las variables micorrización total y arbúsculos, la correlación fue significativamente positiva ($P_{A-MT} = 0.93$ $p<0,0001$)(Figura 12)

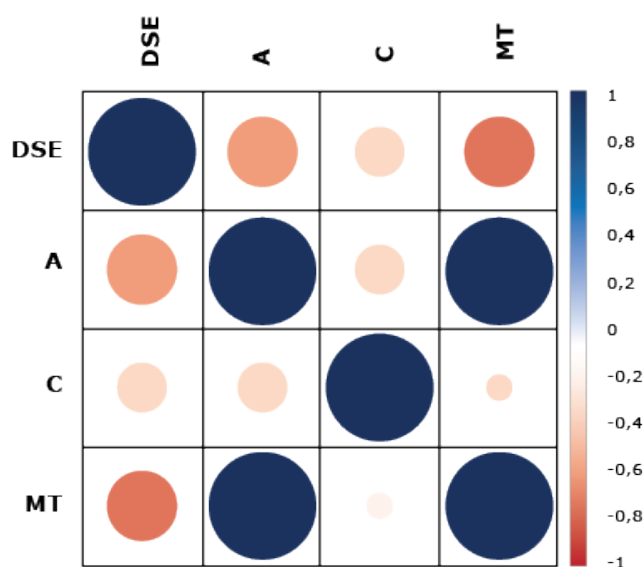


Figura 12. Correlación entre las variables, hongos DSE, arbúsculos (A), coils (C) y micorrización total (MT).

Aislamiento de hongos endofitos

Se obtuvo un total de 82 aislamientos que fueron identificados a 15 especies y 7 géneros. Los aislamientos se dividieron en tres grupos, hongos DSE, *Fusarium* spp. y cultivos blancos, dependiendo de las características de las colonias (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamientos totales de plantas E+ y E-.

Aislamientos caracterizados como morfotipos de:	PLANTAS E+	PLANTAS E-
Hongos DSE	31	17
<i>Fusarium</i>	7	7
Cultivos blancos	11	11

Los organismos agrupados como posibles *Fusarium* spp., aislados tanto de plantas E+ como E-, fueron identificados como *Fusarium oxysporum*. Se observaron tanto macroconidios, como microconidios característicos (**Figura 13**).

Los aislamientos caracterizados como cultivos blancos, no fueron identificados en esta instancia.

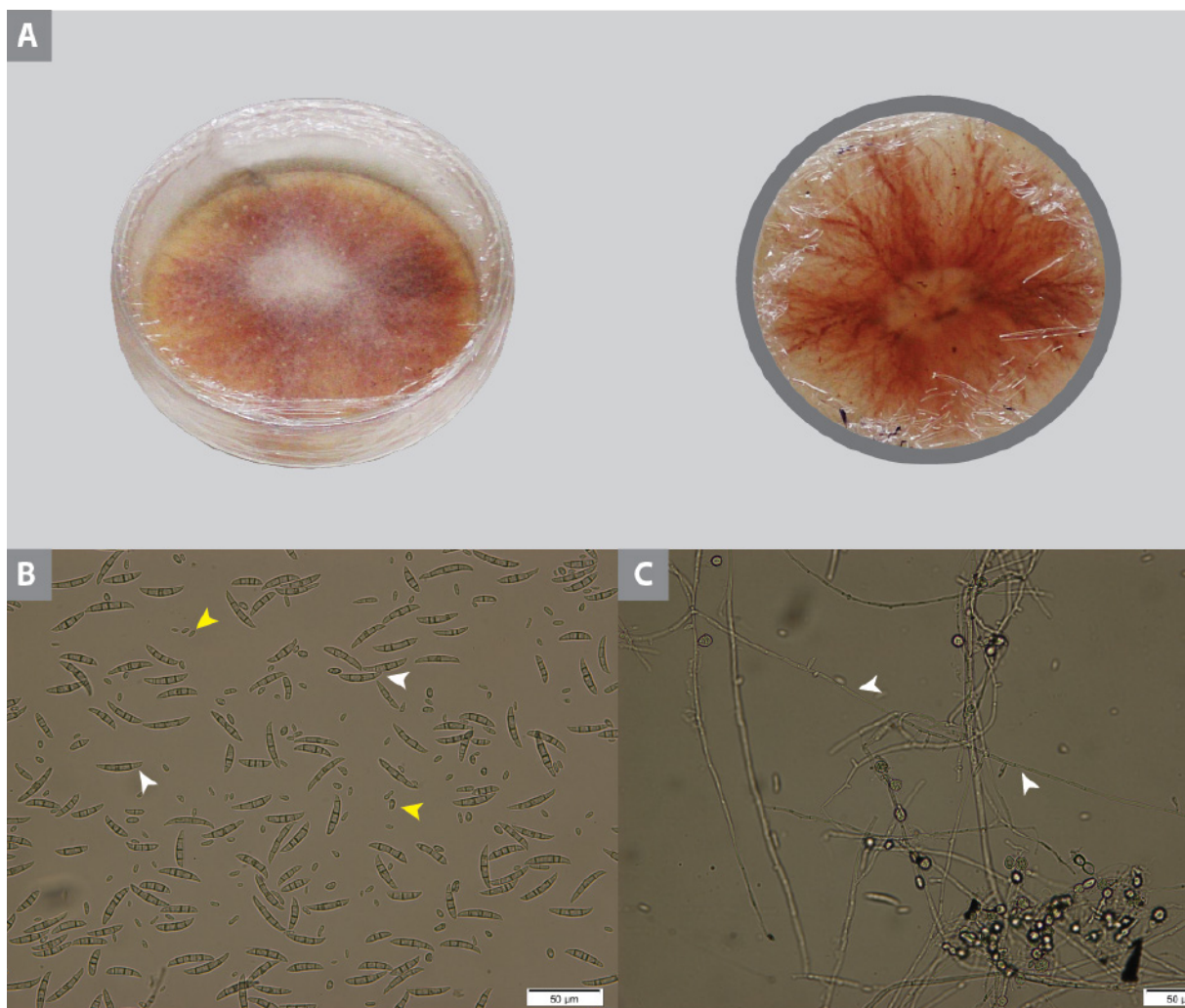


Figura 13. Aspecto general de la colonia y estructuras reproductivas de *Fusarium oxysporum* **A.** Anverso y reverso de la colonia en PDA. **B** y **C.** Detalle de microscopio A: 400X. **B.** Microconidios (flechas amarillas) y macroconidios (flechas blancas). **C.** Monofialide (flechas blancas).

Análisis de aislamientos

Se analizó el número de aislamientos obtenidos según el estatus endofítico y, la correlación entre colonización y aislamientos de hongos DSE obtenidos. No se observaron diferencias significativas para DSE ($Z_{DSE} = -1,599$ $p=0,11$), *Fusarium* sp. ($Z_F = 0,113$ $p=0,91$) y morfotipos de cultivos blancos ($Z_B = 0,143$ $p=0,887$), según el estatus endofítico. Asimismo se analizaron los aislamientos totales, y no mostraron diferencias significativas ($Z_{AT} = -1,143$ $p=0,253$).

La correlación entre colonización y aislamientos de DSE, obtenidos a partir de plantas E+ y plantas E-, no mostró correlación entre las variables ($PCZ-AS = 0.11$ $p=0.72$) (**Figura 14**).

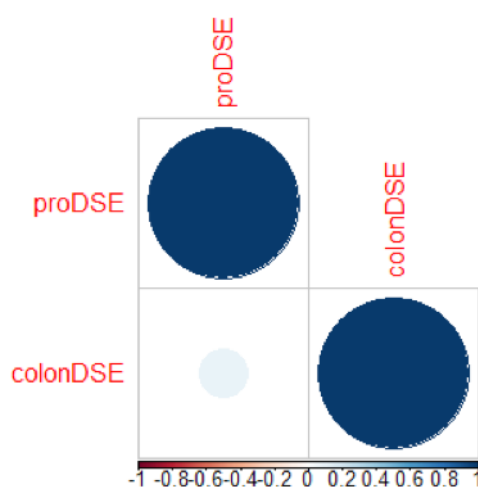


Figura 14. Correlación entre las variables, colonización y aislamiento de hongos DSE .

Clasificación de hongos DSE en morfotipos

Del total de los aislamientos de hongos obtenidos a partir de las raíces de *B. auleticus*, se decidió trabajar con 48 aislamientos, debido a sus características cualitativas como la coloración oscura de la colonia en AEM, siendo esta característica afín a los hongos DSE. Se llevó a cabo la clasificación y agrupamiento en morfotipos, en función de las características de las colonias y velocidad de crecimiento, como se indicó en materiales y métodos. En la **tabla 4** se describen los morfotipos correspondientes a cultivos de 30 días en AEM a 25°C. Se identificaron 34 morfotipos, de los cuales el morfotipo 1 y el morfotipo 13 están presentes tanto en plantas E+, como en plantas E-. De los morfotipos restantes, 20 pertenecen exclusivamente a plantas E+ y 11 son exclusivos de plantas E-. Se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento, lo que permitió agrupar los morfotipos en 5 grupos, que se aprecian en la **tabla 4**.

Tabla 4. Morfotipos de hongos aislados de raíces de plantas de *Bromus auleticus* caracterizados según velocidad de crecimiento y características macroscópicas de las colonias. La velocidad de crecimiento, medida como el diámetro de la colonia a los 10 días, está indicada con diferente color: gris <2,5 cm; amarillo 2,55-3,55 cm; verde claro 3,6-4 cm; verde oscuro 4-4,25 cm y salmón 5 cm.

Morfotipo	Color anverso	Color reverso	Textura	Micelio	Forma	Elevación	E+	E-
1	amarillo grisáceo oscuro	negro parduzco	aterciopelado	aéreo	crenado	chato	3	1
2	naranja	rojizo	aterciopelado	superficial	circular	chato	1	-
3	amarillo	marrón amarillo opaco	aterciopelado	aéreo	circular	chato	1	-
4	gris pardo	negro	aterciopelado	aéreo	circular	chato	1	-
5	negro	negro parduzco	aterciopelado	aéreo	crenado	chato	-	2
6	negro rojizo	gris parduzco	aterciopelado	aéreo	crenado	elevado	-	1
7	negro oliva	oliva grisácea	aterciopelado	aéreo	crenado	chato	-	1
8	rojo grisáceo	negro rojizo	aterciopelado	aéreo	crenado	elevado	-	1
9	gris claro	marrón brillante	algodonoso	aéreo	irregular	elevado	1	-
10	gris claro	negro parduzco	algodonoso	aéreo	circular	elevado	1	-
11	gris amarillento	amarillento	algodonoso	aéreo	crenado	elevado	1	-
12	gris	negro	algodonoso	aéreo	circular	elevado	1	-
13	gris parduzco	marrón	pulverulento	aéreo	irregular	elevado	1	1
14	marrón amarillo grisáceo	marrón	algodonoso	aéreo	circular	elevado	1	-
15	negro		aterciopelado	superficial	crenado	chato	-	1
16	gris amarillento	amarillento	algodonoso	aéreo	crenado	elevado	1	-
17	amarillo naranja	negro parduzco	algodonoso	aéreo	circular	elevado	1	-
18	gris claro	amarillo grisáceo oscuro	algodonoso	aéreo	circular	elevado	-	1
19	gris parduzco	marrón brillante	algodonoso	aéreo	circular	elevado	-	1
20	gris claro	negro	algodonoso	aéreo	circular	elevado	-	1
21	negro	negro	aterciopelado	superficial	circular	chato	-	1
22	gris parduzco	negro parduzco	aterciopelado	aéreo	circular	elevado	-	1
23	marrón grisáceo	negro parduzco	cremoso	aéreo	circular	chato	2	-
24	amarillo naranja	marrón	algodonoso	aéreo	circular	chato	1	-
25	amarillo anaranjado	amarillo anaranjado	pulverulento	superficial	circular	chato	2	-
26	gris	naranja	pulverulento	aéreo	circular	chato	3	-
27	negro parduzco	negro parduzco	algodonoso	aéreo	circular	chato	2	-
28	negro parduzco	negro	aterciopelado	superficial	circular	chato	4	-
29	gris	negro oliva	pulverulento	aéreo	circular	chato	1	-
30	gris amarillento	negro	pulverulento	aéreo	circular	chato	1	-
31	gris claro	amarillo pálido	pulverulento	aéreo	circular	chato	1	-
32	naranja pálido	naranja	aterciopelado	aéreo	circular	chato	-	3
33	gris claro	negro parduzco	algodonoso	aéreo	circular	elevado	-	2
34	amarillo grisáceo oscuro	negro parduzco	algodonoso	aéreo	circular	elevado	-	1

Identificación

De los 48 aislamientos, 7 pudieron ser identificados a nivel género, 5 mediante caracteres morfológicos y 2 por caracteres moleculares. Los 41 aislamientos restantes, no llegaron a identificarse morfológicamente, debido a la ausencia de estructuras reproductivas que permitieran su identificación. En la **Tabla 5**, se presenta la lista de especies y/o géneros identificados.

Tabla 5. Diversidad de los aislamientos de hongos dematiáceos identificados por caracteres morfológicos y/o moleculares y del género *Fusarium*. Se presenta su agrupación según su clasificación taxonómica y estatus de aislamiento.

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO/ ESPECIE	NUMERO DE AISLAMIENTOS	ESTATUS
Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Cylindrocarpon</i>	1	E+
			<i>Cylindrocarpon destructans</i>	1	E+
			<i>Fusarium oxysporum</i>	14	E+ / E-
	Xylariales	Microdochiaceae	<i>Microdochium</i>	2	E+
		Phaeosphaiceae	<i>Phoma</i>	1	E-
Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Drechslera</i>	2	E-

Morfológica

Los aislamientos que pudieron ser identificados morfológicamente correspondieron a los siguientes géneros *Cylindrocarpon*, *Drechslera*, *Microdochium* y *Phoma*. También se identificó a nivel de especie *Cylindrocarpon destructans*. Los hongos aislados exclusivamente de plantas E+ correspondieron a los géneros *Cylindrocarpon*, *Microdochium* y la especie *Cylindrocarpon destructans* (**Figura 15.**), mientras que los aislados exclusivamente de plantas E- corresponden a los géneros *Drechslera* y *Phoma* (**Figura 16.**).

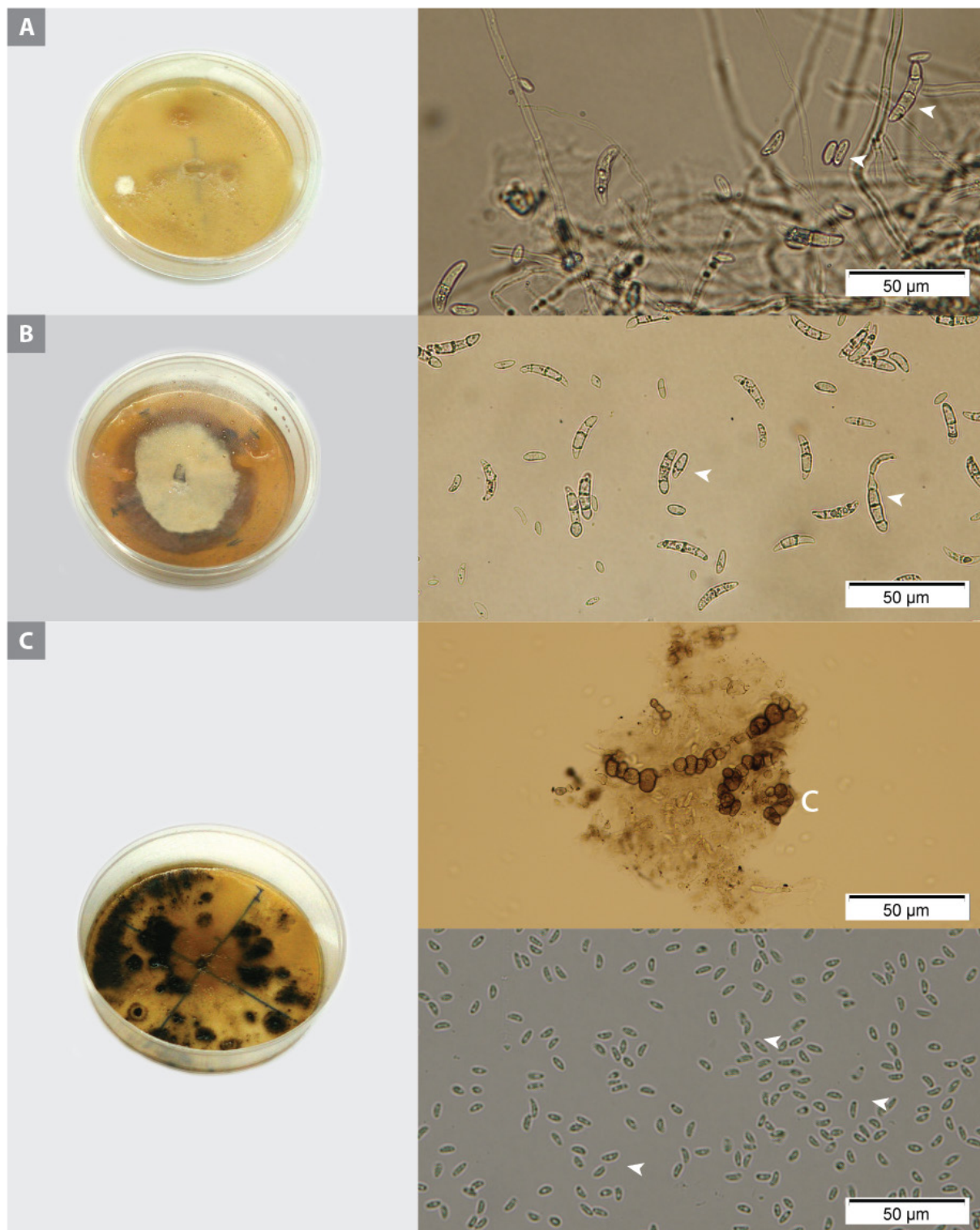


Figura 15. Colonias de hongos aislados e identificados a partir de plantas con *Epichloë*. **A-** *Cylindrocarpon* sp., las flechas muestran macro y microconidios. **B-** *Cylindrocarpon destructans*, con conidioforo (flecha). **C-** *Microdochium* sp. se observan clamidosporas (C) y conidios (flechas). A: 400X.

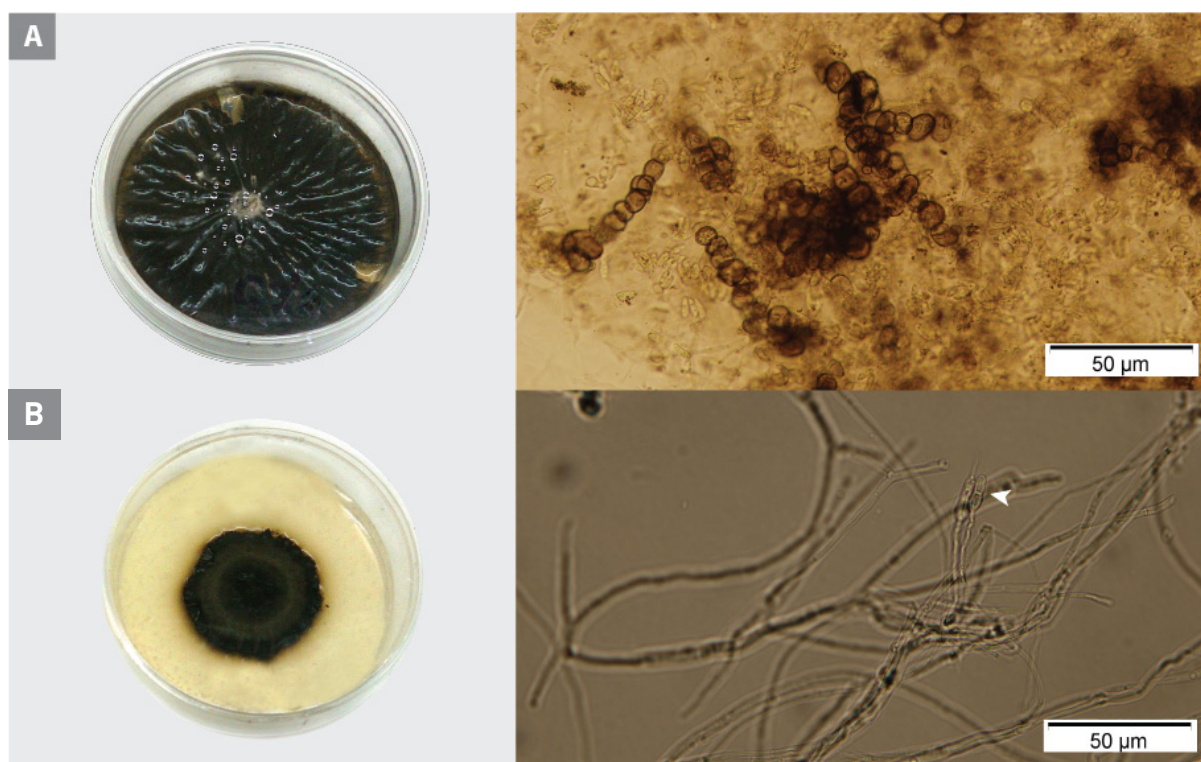


Figura 16: Colonias de organismos aislados e identificados de plantas sin *Epichloë*. **A-** *Phoma* sp. con clamidosporas (C). **B-** *Drechslera* sp. se observa conidióforo (flecha)

Molecular

Fueron identificados únicamente por caracteres moleculares dos aislamientos, uno de ellos con secuencias altamente similares a *Microdochium* sp., mientras que el otro aislamiento, presentó resultados ambiguos al realizar los análisis filogenéticos. Cabe destacar que se realizaron tanto las extracciones como las reacciones de amplificación del ADN en todos los hongos aislados como potenciales DSE, pero los resultados fueron positivos sólo en los dos casos mencionados.

Análisis filogenéticos

Se amplificó la región que codifica para la subunidad menor del ribosoma (5.8S), la que incluye los espacios intergénicos ITS4 e ITS5, para 2 de los aislamientos. La secuencia amplificada comparada en el BLAST arrojó un alto porcentaje de cobertura (92%) y similitud (94%) en uno de los casos con *Microdochium* sp, este resultado fue corroborado mediante un árbol filogenético (**Figura 17**). Al comparar la secuencia de la otra cepa en el BLAST, mostró una similitud del 98-97% y una cobertura del 99% con especies de los géneros *Thielaviopsis* y *Setophoma* y aislamientos de Pleosporales. Los análisis filogenéticos realizados hasta el momento no permitieron resolver en forma consistente la ubicación de la secuencia de esta cepa (**Tabla 6**). Se continuará trabajando en el análisis de esta secuencia.

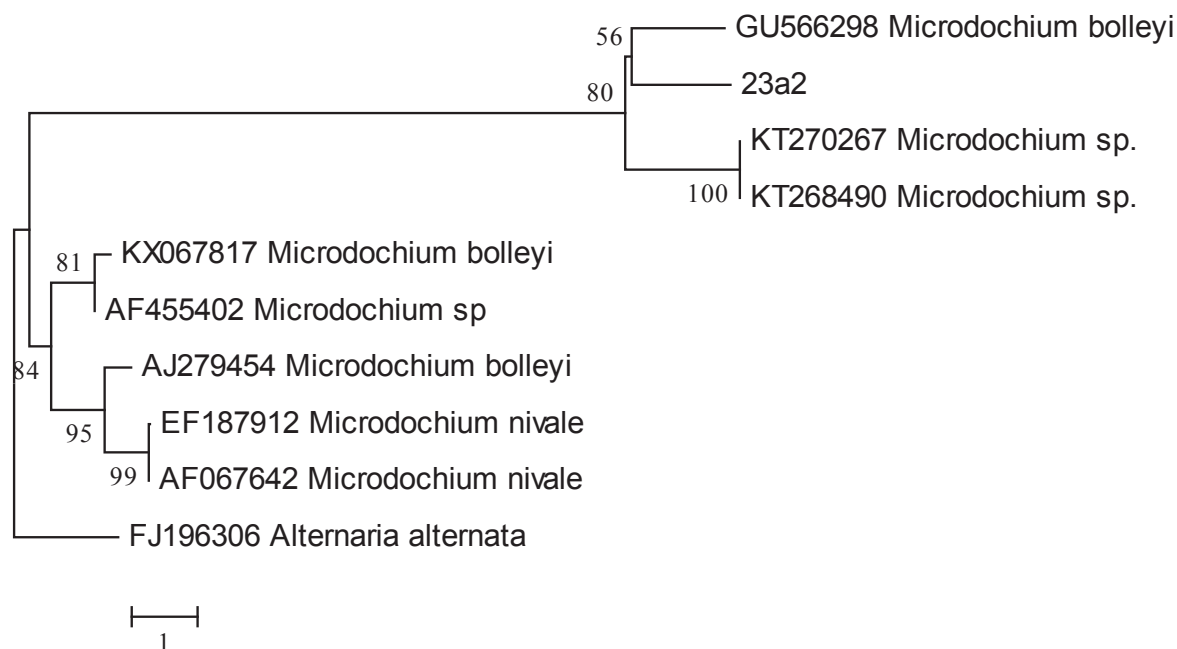


Figura 17. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia, a partir de aislamientos de endofitos dematiáceos, de las raíces de *B. auleticus*, basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: Tamura 3-parámetros. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: *Alternaria alternata*.

Tabla 6. Lista de géneros y especies, con alto porcentaje de cobertura e identidad, obtenidos en el GenBank, a partir de una de las secuencias amplificadas.

GÉNERO/ESPECIES	COBERTURA (%)	IDENTIDAD (%)	CÓDIGO DE ACCESO
<i>Ascomycota</i>	99	98	KU059974
<i>Ascomycota</i>	99	98	KU059962
<i>Ascomycota</i>	99	98	KU059814
<i>Thielaviopsis basicola</i>	99	98	KM519645
<i>Pleosporales</i>	99	98	JN859326
<i>Ascomycota</i>	99	98	EF672299
<i>Ascomycota</i>	99	97	KU059829
<i>Setophoma</i> sp.	99	97	JQ658342
<i>Thielaviopsis basicola</i>	99	97	GQ131878

Análisis ecológicos

Para comparar la comunidad de hongos endofitos en plantas E+ y plantas E-, se calculó el índice de Shannon-Wiener y Simpson, cuyos valores correspondientes pueden observarse en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Índices de Shannon-Wiener y Simpson inverso correspondientes a las comunidades de hongos DSE aislados de las raíces de *Bromus auleticus*.

	PLANTAS E+	PLANTAS E-
Shannon – Wiener (H)	2,77	2,39
Simpson Inverso (1/D)	20	14,3

Los valores de ambos índices fueron mayores, para las plantas E+ (H=2,77 y 1/D=20), respecto a los valores observados para plantas E- (H=2,39 y 1/D=14,3).

DISCUSIÓN

Uno de los requisitos para el manejo sustentable del suelo, que conduzca a un incremento de la productividad, es el reconocimiento de las causas, y la evaluación de los cambios bióticos (estructura y dinámica de las microcomunidades) y abióticos en este medio.

La rizósfera es una zona muy delgada de suelo íntimamente asociada a las raíces (Dobbelaere et al. 2003). Esta zona es rica en nutrientes en comparación con el resto del suelo debido a la acumulación de exudados de las plantas, que proveen de una importante fuente de energía a los microorganismos. Esto se ve reflejado en la abundancia y diversidad de organismos alrededor de las raíces que supera en varios órdenes el resto del suelo (Weller y Thomashow 1994). Las raíces de las plantas son frecuentemente colonizadas por numerosos tipos de organismos presentes en la rizósfera en forma simultánea.

Los endofitos de pastos (*Epichloë* spp.) se asocian de manera mutualista con gramíneas C3 y además de brindarle a sus hospedantes diversos beneficios, se sabe que puede modular la comunidad de organismos con los que la planta interactúa (Omacini et al. 2004). Estos hongos han sido estudiados en el campo de las interacciones múltiples en relación con los hongos que se asocian a las raíces como los hongos MA, con resultados antagónicos. Por un lado se ha observado, que las gramíneas seleccionadas agrónomicamente asociadas a *Epichloë*, inhiben la micorrización del hospedante (Chu-Chou et al. 1992; Guo et al. 1992; Müller 2003; Omacini et al. 2006; Mack & Rudgers 2008; Liu et al. 2011), mientras que en las gramíneas silvestres se ha observado una asociación positiva entre ambos simbioses (Novas et al. 2005, 2009; Arrieta et al. 2015; Vignale et al. 2016, 2017). Otros hongos endofitos, que se han incorporado al estudio de las interacciones múltiples, han sido los hongos DSE.

En este trabajo se estudió por primera vez la asociación entre endofitos foliares *Epichloë* y endofitos de raíz DSE en *Bromus auleticus*.

La hipótesis del trabajo, se centró en la relación entre dos simbioses fúngicas asociados a diferentes tejidos del mismo hospedante. Se esperaba que el endofito foliar *Epichloë* favoreciera la colonización de los hongos DSE. Los resultados mostraron que la colonización de endofitos de raíz fue mayor en plantas E+, sin embargo, las diferencias observadas entre plantas asociadas a *Epichloë* y plantas libres, no fueron significativas, por lo que nuestra hipótesis no fue sustentada por los resultados obtenidos. Los estudios sobre esta interacción son prácticamente nulos. A nuestro conocimiento, sólo hay dos trabajos previos que estudian las interacciones múltiples gramínea-*Epichloë*-hongos DSE. Vandegrift et al. (2015) no observaron diferencias significativas en la colonización de los hongos DSE, en *Agrostis capillaris*. Resultados similares se observaron en el trabajo a campo de Slaughter (2016) con la gramínea *Schedonorus arundinaceus*, donde no se observaron diferencias significativas en la colonización de hongos DSE, debido a la presencia

o ausencia de *Epichloë*. Ambos resultados coinciden con lo observado en esta Tesis.

A partir de estudios previos, se postula que los endofitos *Epichloë* asociados a *Bromus auleticus*, aumentan la micorrización en la planta hospedante (Vignale et al. 2016; 2017). En este trabajo la colonización micorrícica total no presentó diferencias significativas en plantas E+ y E-, lo mismo que observaron Vandegrift et al. (2015) y Slaughter (2016). Sin embargo, al analizar las estructuras por separado, se observó un número significativamente mayor de arbúsculos en las plantas E+, que podría estar asociado a una mayor actividad de los hongos MA. Slaughter (2016) observó en su trabajo, que la presencia del endofito foliar *Epichloë* y la variación genética de la gramínea *Schedonorus arundinaceus*, alteran la formación de estructuras involucradas en la transferencia de nutrientes como los arbúsculos.

Los efectos observados en el desarrollo de gramíneas asociadas a endofitos *Epichloë* son mediados por la producción de metabolitos primarios y secundarios del hongo o como resultado de la asociación simbiótica. Se demostró que los exudados de plantas infectadas con *Epichloë*, incrementan la longitud y ramificación de las hifas pre-infectivas de hongos MA, respecto de plantas no infectadas (Novas et al. 2011). Vignale et al. (2017) demostraron que exudados de *Epichloë* incrementaron la germinación de esporas del hongo MA, *Gigaspora rosea* in vitro. A su vez exudados de las raíces de *B. auleticus* asociadas a *Epichloë* promovieron la colonización, longitud hifal y esporulación de *Rhizophagus intraradices*. Estos compuestos serían incorporados al suelo a través de los exudados radiculares, siendo responsables de modular la comunidad de los microorganismos rizosféricos, quienes, a su vez, tienen un rol central en la utilización de los nutrientes y, por lo tanto, en promover el desarrollo del hospedante y de plantas vecinas. Otros estudios sugieren que los alcaloides pueden ser responsables de la reducción en la colonización micorrícica en plantas E+ (Antunes et al. 2008; Mack y Rudgers 2008).

Larimer et al. (2010) realizaron un meta-análisis entre tres tipos de simbioses, entre ellos, los hongos MA y endofitos foliares, como *Epichloë*. Evaluaron las tendencias entre simbiosis simultáneas y la relación simbiote-planta. La mayoría de los trabajos basados en interacciones, entre hongos MA y hongos endofitos, mostraron una relación negativa entre los simbioses. Las interacciones entre endofitos foliares-planta pueden variar, entre beneficiosas y antagónicas (Ahlholm et al. 2002; Cheplick 2007). Al analizar la relación entre endofitos foliares, con distinta respuesta de interacción, y hongos MA, los resultados fueron diferentes, a lo observado cuando el endofito foliar se encontraba solo. En estos casos, se observó que los efectos negativos de los endofitos, tienden a disminuir en la asociación simultánea con hongos MA, mientras que el efecto de los endofitos beneficiosos no se vio afectado por la interacción simultánea (Larimer et al. 2010).

Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en los que se observó que la presencia de *Epichloë* incrementaba la presencia de arbúsculos, se concluyó que estos endofitos podrían estar favoreciendo la actividad de los hongos MA. También es importante destacar, que los factores abióticos pueden jugar un importante papel y si bien no se realizaron ensayos manipulativos, el mes anterior al muestreo registró un récord en precipitaciones.

Tanto la colonización por hongos DSE como por hongos MA, no presentaron diferencias significativas en plantas con *Epichloë* y plantas libres del endofito foliar. Sin embargo, al analizar la correlación entre ambos endofitos fúngicos, se encontró una correlación negativa. Esto podría indicar algún tipo de antagonismo entre estos dos simbios de raíz. Los estudios sobre este tipo de interacción, entre dos simbios de raíces, son escasos y con resultados contradictorios (Kandalepas et al. 2010; Urcelay et al. 2011; Lingfei, Anna y Zhiwei 2015). Vandegrift et al. (2015) reportaron, en su trabajo a campo, una correlación positiva entre hongos DSE y hongos MA, en la gramínea *Agrostis capillaris*, sin embargo los resultados fueron opuestos al evaluar la colonización por estos hongos, en *Bromus hordeaceus* L., bajo condiciones climáticas extremas. Asimismo, se observó mayor colonización por hongos DSE, en plantas libres de *Epichloë*. Estudios previos mostraron que los exudados de *Dreschlera* sp, hongo endofito aislado de *Lolium multiflorum*, estimularon la longitud y ramificación de las hifas de hongos MA in vitro, demostrando que los hongos DSE pueden afectar el desarrollo de los hongos MA (Scervino et al. 2009). Estos efectos son similares a los producidos por *Epichloë* (Novas et al. 2011). Sin embargo estudios realizados en invernadero, mostraron que tanto *Dreschlera* sp., hongo DSE, como *Cylindrocarpon* sp., también endofito, no incrementaron el porcentaje de colonización por hongos MA en sorgo (Vaz et al. 2012).

Por otro lado, aunque la colonización por hongos DSE en plantas E+ y E- no mostró diferencias significativas, en contraste con este resultado, se obtuvo casi el doble de aislamientos a partir de plantas con endofito aéreo. Estos resultados se reflejaron en la ausencia de correlación entre ambas variables, corroborada en los análisis de correlación de Pearson. La existencia de microorganismos viables, e inclusive metabólicamente activos, asociados a plantas, que no son cultivables en medios y condiciones de laboratorio, ha sido comprobada y ha promovido el desarrollo de métodos de detección independientes del cultivo (Wilson y Lindow, 2000). En nuestro caso, los resultados estarían indicando que algunos de los endofitos de raíz presentes en plantas E- presentarían la imposibilidad de ser aislados y de crecer en las condiciones empleadas. Esto nos lleva a pensar, en principio, que las condiciones distarían de las presentes en su entorno natural y puede ser el caso de hongos con un mayor grado de dependencia por el hospedante y/o por la comunidad de microorganismos asociados, y ocurre, por ejemplo con ciertos simbios obligados (Ritz, 2007). La aplicación de nuevas tecnologías en relación con estudios de diversidad de la comunidad de microorganismos asociados a plantas, tal como la metagenómica, permite detectar organismos extremadamente difíciles de cultivar (Price et al. 2009) y han revelado una gran biodiversidad microbiana desconocida en comparación con los métodos convencionales (Ritz, 2007). Análisis de esta índole y la existencia o no de mayor dependencia por el hospedante o su entorno natural, son aspectos que exceden los límites de este trabajo, pero constituyen cuestiones a considerar en futuros estudios.

La identificación de los organismos fúngicos aislados, es de importancia en el estudio de las interacciones multitróficas. El aislamiento a partir de raíces de *Bromus auleticus* permitió obtener hongos dematiáceos que crecieron desde el interior de las raíces, de los cuales, sólo una minoría (15%) pudo ser identificada taxonómicamente utilizando caracteres morfológicos y/o moleculares. Estos hongos fueron identificados como especies pertenecientes a los géneros *Cylindrocarpon*, *Drechslera*, *Microdochium* y *Phoma*.

El género *Cylindrocarpon*, tiene distribución mundial, encontrándose en ambientes de condiciones diversas, las especies de este género son conocidas como saprobios de suelo, y patógenos de plantas, infectando raíces y tallos (Brayford 1993). Especies de este género han sido estudiadas como patógenos del manzano en Sudáfrica (Tewoldemedhin et al. 2010), pero también existen estudios donde se aisló como endofito a partir de las raíces de *Myrtus communis*, y al inocular en sorgo, se observó un aumento significativo del peso seco en vástago (Vaz et al. 2012). En este trabajo se ha llegado a identificar un aislamiento como *Cylindrocarpon destructans*, debido a las características cualitativas de la colonia y a la presencia de microconidios no septados, obtenido a partir de una planta E+.

Especies del género *Drechslera* han sido aisladas como DSE, en nuestro país, a partir de distintos hospedantes como *Lolium multiflorum* y *Triticum aestivum* (Scervino et al. 2009; Rothen 2010; Cisneros 2011). Asimismo, se co-inoculó una de las cepas en especies vegetales de importancia económica como cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y soja (*Glycine max*), y en ninguno de los casos se observaron efectos deletéreos o síntomas de enfermedad, indicando que la asociación en este caso es benéfica o neutral (Navarro 2008; Lo 2013). Estos resultados coinciden con Vaz et al. (2012), quienes aislaron endofitos del género *Drechslera*, a partir de raíces de *Myrtus communis*, en la zona mediterránea de Europa, y observaron que, si bien al inocular en sorgo, colonizó con éxito las raíces, se mostró neutral ante la asociación. En nuestro trabajo se aislaron dos cepas pertenecientes a este género, ambas asociadas a plantas E-.

Especies del género *Microdochium* han sido descritas por Mandyam et al. (2010) como hongos DSE. En ese estudio, los endofitos de raíz se aislaron de pastos nativos de Kansas, Estados Unidos, asimismo, se realizaron ensayos de re-síntesis, en puerro y *Andropogon gerardi*, y los resultados mostraron que *Microdochium* sp. formó clamidosporas melanizadas en células corticales, pero no se observó la formación de hifas melanizadas. Por otro lado, la asociación de estos hongos tuvo una respuesta positiva para *A. gerardi* y neutral en puerro. El género *Microdochium* ha sido poco estudiado y las especies del género no han sido descritas con claridad (Kwasna y Bateman 2007). En nuestro trabajo dos cepas aisladas de plantas E+ han sido identificadas, como especies pertenecientes a este género, una de ellas mediante técnicas moleculares. En ese caso al

alinear las secuencias en el BLAST, los resultados mostraron alto porcentaje de similitud y cobertura (94%) con la especie *Microdochium bolleyi*. Esta especie ha sido aislada como hongo DSE en nuestro país, a partir de raíces de trigo, hospedante en el que mostró escasa melanización de las hifas pero notables microesclerocios melanizados, además de no mostrar efectos deletéreos en la planta hospedante (Rothen, 2010).

Especies del género *Phoma* han sido descriptas como endofitos DSE, debido a sus hifas septadas oscuras, característica afín a ese grupo (Girlanda et al. 2002; Aveskamp et al. 2009). Recientemente el género ha sido dividido en nueve secciones en base a caracteres morfológicos y análisis moleculares, lo que ha llevado a concluir que este género tiene un origen polifilético (De Gruyter et al. 2013). Especies de este género han sido identificadas como patógenos de gramíneas (Skadsen y Holn, 2004) y otras plantas (Chen et al. 2015), asimismo, como patógenos oportunistas y saprobios en un amplio rango de sustratos (Aveskamp et al. 2010). Silva et al. (2007) han aislado hongos del género *Phoma*, a partir de semillas de *B. auleticus*, previo al desgrane natural, sin embargo, no se observó la presencia de *Phoma* cuando las semillas se recolectaron del suelo. Vaz et al. (2012) también aislaron endofitos septados oscuros, de las raíces de *Myrtus communis*, pertenecientes al género *Phoma*. En este trabajo se obtuvo un aislamiento a partir de una planta E-.

En esta tesis también se han identificado organismos fúngicos como *Fusarium oxysporum*, aislados en igual proporción de plantas E+ y plantas E-. La presencia de esta especie ha sido descrita ya por Arrieta (2014), quien previamente aisló *F. oxysporum*, a partir de muestras de suelo, en presencia de *Bromus auleticus* asociada a *Epichloë pampeana*. El género *Fusarium* es conocido por su capacidad patogénica. Particularmente *F. oxysporum* ha sido citada como causante de damping-off (caída o vuelco de los almácigos) en *Festuca arizonica* Vasey infectada con *Epichloë* (Reddy y Faeth. 2010). Sin embargo, se ha postulado que los hongos endofitos como *Epichloë* protegen a las plantas, incrementando la resistencia a patógenos fúngicos (Bonos et al. 2005). Ejemplos de este comportamiento son el efecto protector del endofito *Epichloë*, asociado a *B. auleticus*, ante un patógeno sistémico como *Ustilago bullata* (Vignale et. al 2013) y frente a fitopatógenos del phylum Chytridiomycota (Arrieta 2014). En este trabajo, se muestrearon plantas sanas y sin ningún tipo de síntoma de enfermedad, por lo que los aislamientos obtenidos pueden ser avirulentos o puede tratarse de patógenos en estado latente. Este aspecto deberá ser evaluado en ensayos adicionales para analizar el grado de patogenicidad correspondiente, lo mismo para los aislamientos de los géneros *Phoma* y *Drechslera*, ya mencionados.

En cuanto a la diversidad y abundancia de los hongos endofitos, estos parámetros fueron mayores en las plantas E+ respecto a las plantas E-. Arrieta (2014) realizó un análisis de la diversidad de hongos de suelo en presencia de *B. auleticus* infectada o no con *Epichloë pampeana*. Si bien en su trabajo, utilizó diferentes tipos de suelo, uno sometido a prácticas agronómicas y otro no,

en ambos casos observó, que la diversidad fue mayor en suelos en presencia de la asociación *B. auleticus*-*E. pampeana*.

En este trabajo, hasta el momento, se han identificado, hongos pertenecientes a los géneros *Phoma* y *Drechslera*, exclusivamente de plantas E-. Estos hongos no sólo han sido descriptos como endofitos septados oscuros, sino también como potenciales patógenos. Mientras que los géneros *Microdochium*, hongo DSE, y *Cylindrocarpon*, citado como saprobio y patógeno, sólo se aislaron de plantas E+. Tal como se mencionó anteriormente, los endofitos foliares, protegen a las plantas, incrementando la resistencia a patógenos fúngicos (Bonos et al. 2005), sin embargo, en este caso se han aislado posibles patógenos tanto de plantas con *Epichloë* como de plantas libres de este endofito. La evaluación de la virulencia de los aislamientos obtenidos permitirá contar con más elementos para sacar conclusiones acerca de la relación entre la comunidad de hongos endofitos con potencial patogénico y la presencia de *E. tembladerae* en *B. auleticus*.

Los antecedentes mencionados, dejan entrever, lo difícil que es generalizar al estudiar las interacciones múltiples en un modelo planta-hongo. Por un lado, debido a la identidad de los distintos simbioses involucrados y su amplio rango de roles ecológicos y por otro, a la influencia de los factores abióticos, en la composición y actividad de la comunidad de hongos presentes en la raíces, tanto DSE como MA. Todos estos aspectos reflejan la complejidad de nuestro modelo de estudio. Por lo tanto, es necesario encarar estudios adicionales para poder entender el tipo de interacción entre las especies de endofitos aisladas y el hospedante en asociación o no con *E. tembladerae*.

CONCLUSIONES

- No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de colonización de hongos MA y hongos DSE, entre plantas asociadas a *Epichloë* y plantas libres de *Epichloë*.
- Se observó un mayor número de arbusculos en plantas E+, lo que podría estar relacionado a una mayor actividad de los hongos MA.
- Se encontró una mayor diversidad y abundancia de endofitos DSE en las plantas asociadas a *Epichloë*, quien podría modular la comunidad fúngica asociada.
- Hasta el momento se han identificado hongos DSE, pertenecientes a los géneros *Drechslera*, *Microdochium* y *Phoma*. Otros hongos aislados han sido *Cylindrocarpon destructans*, *Cylindrocarpon* sp. y *Fusarium oxysporum*. Todos han sido citados como endofitos pero también como potenciales patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

Addy HD, Piercey MM y Currah RS (2005). Microfungal endophytes roots. Canadian Journal of Botany, 2005, Vol. 83, No. 1: 1-13.

Afkhami ME y Rudgers JA (2008). Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. Am Nat 172:405-416

Ahlholm JU, Helander M, Lehtimäki S, Wali P y Saikkonen K (2002). Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. Oikos 99:173-183

Arrieta A (2014). Los endofitos fúngicos como inductores de cambios en la rizósfera de gramináceas nativas. [Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas]. Argentina: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Arrieta A, Iannone LJ, Scervino J, Vignale M y Novas M (2015). A foliar endophyte increases the diversity of phosphorus-solubilizing rhizospheric fungi and mycorrhizal colonization in the wild grass *Bromus auleticus*. Fungal Ecol 17:146-154

Albornoz P, Varela O y Díaz Ricci J. (2014). Micorrizas arbusculares y endofitos septados oscuros en tres especies de Rosáceas de Argentina. Revista Agronómica del noroeste argentino. 51(1), 9-19.

Antunes PM, Miller J, Carvalho LM, Klironomos JN y Newman JA (2008). Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. Funct Ecol 22:912-918

Aveskamp MM, Verkley GJM, de Gruyter J, Murace MA, Perelló A, Woudenberg JHC, Groenewald JZ y Crous PW (2009). DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section Peyronellaea and multiple taxonomic novelties. Mycologia 101: 363-382. <http://dx.doi.org/10.3852/08-199>

Aveskamp MM, de Gruyter J, Woudenberg JHC, Verkley GJM y Crous PW (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> et al. 2010).

Ayala W, Bemhaja M, Cotto B, Do Canto J, García J, Olmos F, Real D, Rebuffo M, Reyno R y Rossi C (2010). Forrajas; catálogo de cultivares 2010. Montevideo, INIA

Bacon C y White J (2000). Microbial endophytes. New Brunswick: CRC Press.

Bago B (2000). Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226:263-274

Ban Y, Tang M, Chen H, Xu Z y Zhang H (2012). The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. *PLoS ONE* 7(10): e47968. doi:10.1371/journal.pone.0047968

Barrow J y 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 JR (2003). Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*. Volume 13:5, pp 239-247.

Bartholdy BA, Berreck M y 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>

Bécard G y Piché Y (1989). Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55:2320-2325

Black KG, Mitchell DT y Osborne BA (2000). Effect of mycorrhizal enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant Cell Environ* 23:797-809 doi:10.1046/j.1365-3040.2000.00598.x

Bonos SA, Wilson MM, Meyer WA y Funk CR (2005). Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. *Applied Turfgrass Science*. 10:1094.

Brayford D (1993). *Cylindrocarpum*. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. In L. L. Singleton, J. D. Mihail, & C. M. Rush (Eds.), (pp. 103–106). St. Paul: American Phytopathologic Society Press.

Bustamante E, Ruiz M, Morici E, Babinec FJ y Pordomingo AB (2012). Biomasa acumulada

e indicadores de calidad nutritiva en cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trinius ex Nees). RIA Revista de investigaciones agropecuarias 38:251-256

Burkart AE (1969). Flora ilustrada de entre ríos (Argentina).

Caldwell BA y Jumpponen A (2003). Utilization of heterocyclic organic nitrogen by mycorrhizal fungi. In: Fourth International Conference on Mycorrhizae, Montreal, Canada. 10–15th August 2003: 311

Casas C, Omacini M, Montecchia MS y Correa OS (2011). Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. Plant Soil 340:347-355

Chen Q, Zhang K, Zhang G y Cai L (2015). A polyphasic approach to characterise two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China. Phytotaxa 197 (4): 267–281 <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.197.4.4>

Cheplick GP (2007). Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from Eurasia and North Africa under extreme resource limitation. Environ Exp Bot 60:202–210

Chu-Chou M, Guo B, An ZQ, Hendrix J, Ferriss R, Siegel M, Dougherty C y Burrus P (1992). Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *Acremonium coenophialum* endophyte. Soil Biology and Biochemistry 24:633-637

Cisneros GS (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.

Clark E, White J y Patterson R (1983). Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus. J Microbiol Methods 1:149-155

Cofré N, Becerra A, Nouhra E y Soteras F (2012). Arbuscular mycorrhizae and darkseptate endophytes on *Atriplex cordobensis* in saline sites from Argentina. Journal of Agricultural Technology, 8(7), 2201-2214.

Currah RS, Tsuneda A, y Mukarami S (1993). Morphology and ecology of *Phialocephala fortinii* in roots of *Rhododendron brachycarpum*. Canadian Journal of Botany, 71(12), 1639-1644.

De Gruyter H, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, y Crous, PW (2013). Redisposition of *phoma*-like anamorphs in pleosporales. *Studies in Mycology*, 75, 1-36. <http://doi.org/10.3114/sim0004>

Diene O y Narisawa K (2009). The use of symbiotic fungal associations with crops in sustainable Agriculture. *Journal of developments in sustainable Agriculture*, 4: 50-56.

Domsch KH, Gams W y Anderson TH (1980). *Compendium of soil fungi* (Academic P). London: Academic press.

Dobbelaere S, Vanderleyden J y Okon Y (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 2003;22:107–149

Ellis MB (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 20, 783–791. <http://doi.org/10.2307/2408678>

Fernández N, Messuti M y 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)

Fernández N, Fontenla S y 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>

Finlay RD (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* 59:1115-1126

Fracchia S, Aranda A, Gopar A, Silvani V, Fernandez L y 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>

Gallaud I (1905). Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Revue Générale de Botanique* 17: 7–48, 66–85, 123–136, 223–239, 313–325, 423–433, 479–496.

Gao K y Mendgen K (2006). Seed-transmitted beneficial endophytic *Stagonospora* sp. can penetrate the walls of the root epidermis, but does not proliferate in the cortex, of *Phragmites australis*. *Can. J. Bot.* 84: 981–988. doi:10.1139/B06-056

Gasser M, Ramos J, Vegetti A y Tivano JC (2005). Digestión de láminas foliares de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees sometidas a diferentes tiempos de incubación ruminal. Agricultura Técnica 65:48-54

Girlanda M, Ghignone S y Luppi AM (2002). Diversity of sterile root-associated fungi of two Mediterranean plants. New Phytol. 155, 481–498.

Gundel PE, Iannone L, Perez LI y Irisarri JGN (2010). Variación poblacional del pasto perenne *Hordeum comosum* como anfitrión de endofitos *Neotyphodium* en estepas patagónicas. In: IV Reunión Binacional de Ecología, , XXIV Reunión Argentina de Ecología.

Gundel PE, Garibaldi LA, Martínez-Ghersa MA y Ghersa CM (2011). *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. Environmental and Experimental Botany 71 (2011) 359–366

Guo B, Hendrix J, An ZQ y Ferriss R (1992). Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. Mycologia 84:882-885

Gutiérrez HF y Pensiero JF (1998). Sinopsis de las especies argentinas del género *Bromus* (Poaceae). Darwiniana 35:75-114

Grunig CR, Duó A y Sieber TN (2006). Population genetic analysis of *Phialocephala fortinii* s.l. and *Acephala applanata* in two undisturbed forests in Switzerland and evidence for new cryptic species

Haselwandter K y Read DJ (1982). The significance of root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities. Oecologia 53:352-354.

Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q y Vivanco JM (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. Botany 92:267-275

Iannone LJ y Cabral D (2006). Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. Symbiosis 41:61-69

Iannone LJ, Mc Cargo PD, Giussani LM y Schardl CL (2012a). Geographic distribution patterns of vertically transmitted endophytes in two native grasses in Argentina. Symbiosis:1-12

Iannone LJ, Novas MV, Young CA, De Battista JP y Schardl CL (2012b). Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. *Fungal Ecol* 5:357-363.

Iannone LJ, White Jr JF, Giussani LM, Cabral D y Novas MV (2011). Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycol Prog* 10:9-19

INTA. <http://inta.gob.ar>

Johnson NC, Graham JH y Smith FA (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>

Jumpponen A y Trappe JM (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonising fungi. *New phytologist*, 140: 295-310.

Jumpponen A y 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>

Jumpponen A (2001). Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11(4), 207-211. <http://doi.org/10.1007/s005720100112>

Kandalepas D, Stevens KJ, Shaffer GP y Platt WJ (2010). How abundant are root-colonizing fungi in southeastern Louisiana's degraded marshes? *Wetlands* 30:189–199 DOI 10.1007/s13157-010-0017-y.

Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Knapp DG, Pintye A y Kovács GM (2012). The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas. *PLoS ONE* 7(2): e32570. doi:10.1371/journal.pone.0032570

Kovács GM y Szigetvári C (2002). Mycorrhizae and other root associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the great Hungarian Plain. *Phyton* 42:211–223.

Kwasna H y Bateman GL. (2007). *Microdochium triticolica* sp. nov. from the roots of *Triticum aestivum* in the United Kingdom. *Mycologia* 99:765–776.

Lacap DC, Hyde KD y Liew ECY. (2003). An evaluation of the fungal ‘ morphotype ’ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12, 53-66.

Lahlali R, McGregor L, Song T, Gossen BD, Narisawa K y Gary P (2014). *Heteroconium chaetospira* Induces Resistance to Clubroot via Upregulation of Host Genes Involved in Jasmonic Acid, Ethylene, and Auxin Biosynthesis. *PLoS ONE* 9(4): e94144. doi:10.1371/journal.pone.0094144

Larimer AL, Bever JD y Clay K (2010). The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis*. DOI 10.1007/s13199-010-0083-1

Leuchtmann A (1992) Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Nat Toxins* 1(150–1):62

Li CJ, Nan ZB, Paul VH, Dapprich PD y Liu Y (2004). A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China. *Mycotaxon* 90: 141-147.

Li T, Liu M.J, Zhang XT, Zhang HB, Sha T y Zhao ZW (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>

Lingfei L, Anna Y y Zhiwei Z 2005. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 54:367–373 DOI 10.1016/j.femsec.2005.04.011.

Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Fraser K, Ryan GD, Newman JA y Rasmussen S (2011) Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus* spp. fungi in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. *Funct Ecol* 25:910-920

Lizarraga SV, Ruiz AI, Salazar SM y Albornoz PL (2015). Micorrizas vesículo-arbusculares, endofitos 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.

Lo T. (2013) Hongos como Bio-inoculantes: Evaluación del efecto de una cepa de hongo DSE y una de micorriza en plantas de importancia económica. [Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas]. Argentina: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Lo T y Rodríguez MA. (2014). En: Hongos y otros organismos que mejoran la producción agraria. Díaz-Zorita M; Correa OS, Fernández Caniggia MV y RS Lavado Eds. Facultad de Agronomía. UBA. Pp. 91-97.

Mack KML y Rudgers JA (2008) Balancing multiple mutualists: Asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos* 117:310-320

Mahmoud RS y Narisawa K (2013). A New Fungal Endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions. *PLoS ONE* 8 (11), e78746

Malinowski DP y Belesky DP (2006) Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. *Grassl Sci* 52:1-14

Mandyam K y 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, Loughin T y Jumpponen A (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4), 813-821.

Mandyam KG y Jumpponen A (2015) Mutualism–parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. doi: 10.3389/fmicb.2014.00776

Marulanda A, Azcon R y Ruiz Lozano JM (2003) Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiol Plant* 119:526-533

McGonigle T, Miller M, Evans D, Fairchild G y Swan J (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495-501

Menoyo E, Becerra AG y 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>

Millot JC (2001) *Bromus auleticus*: una nueva especie domesticada. Documento de recursos fitogenéticos PROCISUR, Diálogo LVI, Montevideo:3-

Millot JC (1999). *Bromus auleticus* Trinius. Otra gramínea forrajera perenne invernol. Revista Oficial del Instituto Nacional de Semillas 2:25

Moraes C y Oliveira J (1990). Avaliação agronômica preliminar de genótipos de *Bromus auleticus* Trinius. EMBRAPA-CNPO

Müller J (2003). Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonisation of *Lolium perenne*. Funct Plant Biol 30:419-424

Munsell (1954). Munsell Soil Colour Chart, Munsell Color Company, Inc., Baltimore, MD, USA.

Narisawa K, Ohki KT y Hashiba T (2000). Suppression of clubroot and *Verticillium yellows* in Chinese cabbage in the field by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. Plant Pathology •DOI: 10.1046/j.1365-3059.2000.00425.x

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.

Nelson PE, Toussoun TA y Marasas WFO (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University Press; 1983.

Newsham KK (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 KK (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>

Novas MV, Cabral D y Godeas AM (2005). Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. Symbiosis 40:23-30

Novas MV, Collantes M y Cabral D (2007). Environmental effects on grass endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. FEMS Microbiol Ecol 61:164-173

Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM y Cabral D (2009). Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. Mycol Prog 8:75-81

Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM y Scervino JM (2011). Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 55:19-28

Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM y Müller CB (2001). Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* 409:78-81

Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM y Otero P (2004). Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos* 104:581-590

Omacini M, Eggers T, Bonkowski M, Gange AC y Jones TH (2006). Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Funct Ecol* 20:226-232

Parniske M (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6:763-775

Phillips JM y Hayman DS (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *T Brit Mycol Soc* 55:158-161

Peterson RL, Massicotte HB y Melville LH (2004). *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. CABI

Peterson RL, Wagg C y Paultler M (2008). Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function? *Canadian journal of Botany*, 86: 445-456.

Poole RW (1974). *An Introduction to Quantitative Ecology*. (McGraw-Hill, Ed.). New York.

Price LB, Liu CM, Melendez JH, Frankel YM, Engelthaler D y Aziz M (2009). Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. *PLoS ONE* 4: e6462. pmid:19649281

R Core Team (2016). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

Reddy MN y Faeth SH (2010). Damping-off of *Festuca arizonica* caused by *Fusarium*. *American Journal of Plant Sciences* 1:104-105.

Regvar M, Likar M, Piltaver A, Kugonič N y Smith JE (2010). Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil*, 330 (2010), pp. 345-356

Ritz K (2007) The Plate Debate: cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 358–362.

Rodríguez RJ, White JF, Arnold AE y Redman RS (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>

Rothen CP (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.

Rothen C, Miranda V, Aranda-Rickert A, Fracchia S y Rodríguez MA (2017). Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages. *Applied Soil Ecology*, 120, 62-69.

Saikkonen K (2000). Kentucky 31, far from home. *Science* 287:1887-1887

Salgado Salomón M, Barroetaveña C y 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>

Scervino JM, Gottlieb A, Silvani VA, Pérgola M, Fernández L y Godeas AM (2009). Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biology Biochem* 41:1753-1756

Schardl CL, Leuchtmann A y Spiering MJ (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol* 55:315-340

Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR y Mallik UP (2007). Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry* 68:980-996.

Schüßler A, Schwarzott D y Walker C (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105:1413-1421

Sieber T (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualist?. *Fungal Biology Reviews* 21: 75-89

Silva GM, Maia MS, Moraes COC, Medeiros RB, Silva CS y Pereira DD (2007). Fungos associados a sementes de cevadilha vacariana (*Bromus auleticus*) coletadas nas plantas e no solo. *Fitopatologia Brasileira* 32:353-357. 2007.

Silvani V, Fracchia S, Fernández L, Pérgola M y 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>

Skadsen RW y Holn TM (2004). Use of *Fusarium graminearum* transformed with gfp to follow infection patterns in barley and *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:45-53.

Slaughter LC (2016). Effects of *Epichloë coenophiala*-tall fescue symbiosis on plant-microbe-soil interacciones in a temperate pasture. Theses and Dissertations--Plant and Soil Sciences. 76. http://uknowledge.uky.edu/pss_etds/76

Simpson EH (1949). Measurement of Diversity. *Nature (Lond)*, 163, 688

Smith S y Read D (1997). *Mycorrhizal symbiosis* (2nd edn.). San Diego: Academic press.

Smith SE, Smith FA y Jakobsen I (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162:511-524

Smith SE y Read DJ (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.

Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE y Blackwell M (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol Spectrum* 5(5):FUNK-0053-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016.

Surono y Narisawa K (2017). The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. *Fungal Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.04.001>

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A y Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Tewoldemedhin YT, Mostert L y McLeod A (2011). *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *Eur J Plant Pathol* 129:637–651 DOI 10.1007/s10658-010-9728-4

Traverso JE (2001) Colecta, conservación y utilización de los recursos genéticos de interés forrajero nativo y naturalizado. *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (cebadilla chaqueña). *Diálogo LVI* Los recursos fitogenéticos del género *Bromus* en el cono sur:7-18

Tellenbach C y Sieber TN (2012). Do colonization by dark septate endophytes and elevated temperature affect pathogenicity of oomycetes?. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01415.x>

Tellenbach C, Sumarah MW, Grünig CR y Miller JD (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>

Upton R, Read DJ y Newsham KK (2009). Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza*, 20: 1-11.

Urcelay C, Acho J y Joffre R (2011). Fungal root symbionts and their relationship with fine root proportion in native plants from the Bolivian Andean highlands above 3,700 m elevation. *Mycorrhiza* 21:323–330 DOI 10.1007/s00572-010-0339-x.

Usuki F y Narisawa K (2007). A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a non-mycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia*, 99 (2): 175–184.

Vandegrift R, Bitty RA y Laurel PM (2015). The herbaceous landlord: integrating the effects of symbiont consortia within a single host. *Peer J*. 3:e1379

Vandenkoornhuyse P, Baldauf SL, Leyval C, Straczek J y Young JPW (2002). Extensive fungal diversity in plant roots. *Science*, 295(5562), 2051. <http://doi.org/10.1126/science.295.5562.2051>

Väre H, Vestberg M y Eurola S (1992). Mycorrhizae and root-associated fungi in Spitsbergen. *Mycorrhiza* 1: 93-104.

Vaz ABM, Sampedro J, Siles JA, Vazquez JA, García-Romera I, Veirheilig H, Rosa CA y

Ocampo JA (2012). Arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* in presence of root endophytic fungi of *Myrtus communis*. *Applied Soil Ecology*, 61: 288-294.

Vignale MV, Astiz-Gassó MM, Novas MV y Iannone LJ (2013). *Epichloë* endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). *Biol Control* 67:1-7

Vignale MV, Iannone LJ, Pinget AD, De Battista JP y Novas MV (2016). Effect of *Epichloë* endophytes and soil fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of a wild grass. *Plant Soil* 405:279–287

Vignale MV, Iannone LJ, Scervino JM y Novas MV (2017). *Epichloë* exudates promote in vitro and in vivo arbuscular mycorrhizal fungi development and plant growth. *Plant Soil*. DOI 10.1007/s11104-017-3173-5

Vohník M, Borovec O, Župan I, Vondrášek D, Petrtyl M y Sudová R (2015). Anatomically and morphologically unique dark septate endophytic association in the roots of the Mediterranean endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Mycorrhiza* DOI 10.1007/s00572-015-0642-7

Walker JF, Aldrich-Wolfe L, Riffel A, Barbare H, Simpson NB, Trowbridge J y 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>

Wang J, Li T, Liu G, Smith J y Zhao Z (2016) Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. doi: 10.1038/srep22028

Wei YK, Gao YB, Xu H, Su D, Zhang X, Wang YH, Lin F, Chen L, Nie LY y Ren AZ (2006). Occurrence of endophytes in grasses native to northern China. *Grass Forage Sci* 61:422–429

Weller DM y Thomashow LS (1994). Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and Release of GMOs*, pp. 1–18. Edited by F. O’Gara, D. N. Dowling & B. Boesten. New York: VCH.

Wilson D (1995). Endophyte the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73(2), 274-276.

Wilson M y Lindow SE (2000). Viable but nonculturable cells in plant-associated bacterial populations. *Nonculturable Microorganisms in the Environment* (Colwell RR Grimes DJ, eds), pp. 229–241. ASM Press, Washington, D.C.

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>

Yonezawa M, Takahashi J, Hashiba T, Usuki F y Narisawa K (2004). Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* and *Chinese cabbage*. *Mycoscience* 45:367-371.

Yu TEJ-C, Egger KN y Peterson RL (2001a). Ectendormicorrhizal associations – characteristics and functions. *Mycorrhizal* 11:167-177.[doi:10.1007/s005720100110](http://doi.org/10.1007/s005720100110)

Yu T, Nassuth A y Peterson RL (2001b). 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, Li T y Zhao Z-W (2013). Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in Southwest China. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 22:532–545 DOI 10.1080/15320383.2013.750267.

Zhao X, Yuan S, Song H, Su X, Mao H, Shen W, Qu X y Dong J (2015). Arbuscular mycorrhizal and dark septate fungal associations in riparian plants of the Three Gorges Reservoir Region, Southwest China. *Aquatic Botany* 133 (2016) 28-37

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Extracto de Malta (AEM)

Malta.....20 g
Glucosa.....20g
Peptona.....2g
Agar.....15 g
Agua destilada..1000 ml

Agar Extracto de Malta con cloranfenicol (AEMc)

Malta.....20 g
Glucosa.....20g
Peptona.....2g
Agar.....15 g
Cloranfenicol...100 mg
Agua destilada..1000 ml

Caldo Extracto de Malta (CEM)

Glucosa.....20 g
Malta.....20 g
Peptona.....2g
Agua destilada..1000 ml

Agar-Clavel

Agar.....15g
Agua destilada.....1000ml
4 trozos (0,5mm²)de hojas jóvenes de *Dianthus caryophyllus*