



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Impacto de la interacción endofitos fúngicos - plantas exóticas
invasoras en ecosistemas nativos**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas.

Lic. María Fernanda D'Jonsiles

Directora de tesis: Cecilia Cristina Carmarán

Directora asistente de tesis: María Victoria Novas

Consejera de Estudios: María Victoria Novas

Lugar de trabajo: INMIBO – CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Fecha de defensa: Buenos Aires, 31 de agosto de 2023

IMPACTO DE LA INTERACCIÓN ENDÓFITOS FÚNGICOS -PLANTAS EXÓTICAS INVASORAS EN ECOSISTEMAS NATIVOS

Resumen

Los endófitos fúngicos son organismos que juegan un rol clave en los ecosistemas. Son capaces de promover el desarrollo vegetal, modular el establecimiento de comunidades vegetales y rizosféricas, incluyendo micorrizas, y promover cambios en el suelo. En este trabajo se estudiaron las relaciones establecidas entre hongos endofíticos foliares y la planta *Jatropha curcas* L. con los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la comunidad endofítica asociada a *Jatropha curcas* y evaluar si esta asociación se correlaciona con: -procesos de retroalimentación planta-suelo, -cambios en la microbiota rizosférica y en el suelo, y si dichos cambios tienen efecto sobre el desarrollo vegetal de plantas conespecíficas y plantas nativas.
2. Analizar la actividad biospeckle de las hojas y su potencial aplicación para la detección temprana de endófitos foliares.
3. Identificar y caracterizar las cepas responsables de los efectos observados.

Los resultados obtenidos sugieren que los endófitos foliares: -no promoverían procesos de retroalimentación positiva para plantas conespecíficas, -promueven la colonización micorrízica en *Jatropha curcas*, así como en otras especies y que dicha asociación sería responsable de modular ciertos parámetros del suelo, -pueden ser detectados sin intervención destructiva por el método de biospeckle. Adicionalmente los resultados obtenidos señalan que cepas del género *Alternaria* serían los principales responsables de las respuestas analizadas durante este trabajo, el cual pretende ser un aporte para el desarrollo de nuevas herramientas para una agricultura sustentable.

Palabras Clave: endófitos fúngicos, retroalimentación planta-suelo, micorrizas, parámetros de suelo, desarrollo vegetal, *Alternaria*, biospeckle.

IMPACT OF THE INTERACTION OF FUNGAL ENDOPHYTES - INVASIVE EXOTIC PLANTS IN NATIVE ECOSYSTEMS

Abstract:

Fungal endophytes are organisms that play a key role in ecosystems. They are able to promote plant development, modulate the establishment of plant and rhizosphere communities, including mycorrhizae, and promote changes in the soil. In this work, the relationships established between foliar endophytic fungi and the plant *Jatropha curcas* L. were studied with the following objectives:

1. Characterize the endophytic community associated with *Jatropha curcas* and assess whether this association correlates with: -plant-soil feedback processes, -changes in the rhizospheric and soil mycobiota, and whether these changes have an effect on the plant development of conspecific and native plants.
2. Analyze the biospeckle activity of the leaves and its potential application for the early detection of foliar endophytes.
3. Identify and characterize the strains responsible for the observed effects.

These results suggest that foliar endophytes: -do not promote positive feedback processes for conspecific plants, -promote mycorrhizal colonization in *Jatropha curcas*, as well as in other species, and that this association would be responsible for modulating certain soil parameters, -may be detected without destructive intervention by the biopeckle method. Additionally, the results obtained indicated that strains of the *Alternaria* genus would be the main responsible for the responses analyzed during this work, which aims to be a contribution to the development of new tools for sustainable agriculture.

Key words: fungal endophytes, soil-plant feedback, mycorrhizae, soil parameters, vegetal development, *Alternaria*, biospeckle.

Agradecimientos:

A Ema, mi compañero de vida y a nuestras hijas, por ser mi soporte esencial.

A mis padres, por darme la libertad de emprender este camino. A mis hermanas, porque con ellas aprendí a jugar, y jugando, la vida es más linda.

A Gloria, por siempre ofrecerse para dar una mano, sobre todo, cuidando a mis hijas mientras yo trabajaba.

A mis amigos, todos, por estar ahí siempre, ayudando, escuchando, dando consejos.

A mis directoras Ceci y Vicky por la paciencia y permitirme recorrer este camino a mi tiempo, y a los tiempos que no se pueden manejar.

A Andres Dolinko, por su apoyo incondicional siempre y por su amistad

A Andrea Romero y Silvia Lopez, por compartir su amor a la ciencia y al mundo de los hongos.

A Leopoldo Iannone, A SusanaP y Susana B

A mis compañeros del labo 5: Esteban E, Mariana, Caro R, Esteban C, Rocio, Jessica, Franco, Caro T, Lucas T.

A los laboratorios 70, 69, 6, 7 y 8 del INMIBO

A Alejandra Fazzio y Stella Romero

A Gustavo Galizzi

A Mariana, Diego y Rita

Al Ing Diego Wassner

Al CONICET y a la UBA

Al INMIBO, al IFIR y a la FAUBA

“No hay nada como buscar si quieres encontrar algo. Normalmente encuentras algo si miras bien, pero no siempre es exactamente lo que buscabas.”

J.R.R. Tolkien

Este trabajo está dedicado a Ema y a nuestras hijas Agustina y Julieta, quienes llegaron a mi vida en medio de esta locura para alegrar e iluminar mis horas. Quiero que sepan que todo el sacrificio y el esfuerzo, tarde o temprano, dan sus frutos. Que la paciencia y perseverancia a veces son las mejores aliadas. Y aunque a veces los resultados no son lo que esperamos, siempre algo bueno, grande y asombroso surge mientras buscamos. Por eso vale la pena seguir haciéndonos preguntas y buscando respuestas...

... y que el camino nos siga sorprendiendo.

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	21
<i>Jatropha curcas</i> L.	24
Descripción del género	24
Distribución	25
Aplicaciones	26
<i>Jatropha curcas</i> como cultivo energético	28
Endofitos fúngicos	29
Relaciones de retroalimentación	32
Interacciones biológicas y fenómenos de retroalimentación	33
Hipótesis de trabajo	35
Objetivo general	36
Objetivos específicos	36
CAPÍTULO 1: Comunidad endofítica en <i>Jatropha curcas</i>. Impacto en comunidades rizosféricas y parámetros de suelo	39
Abreviaturas del Capítulo 1	41
1.1 Introducción	43
Endofitos fúngicos (clase III)	45
Suelo	43
Parámetros de Suelo	46
pH	46
Conductividad eléctrica	46
Carbono	47
Fósforo	47

Nitrógeno	49
Organismos rizosféricos	50
Hongos de la rizósfera (biocontroladores, fitopatógenos y solubilizadores de P) y hongos micorrícicos arbusculares (HMA)	50
Importancia de este estudio	52
1.2 Objetivos e hipótesis	53
1.3 Materiales y métodos	55
Área de estudio	55
Material vegetal	55
Estatus endofítico	55
Preparación de las macetas	56
Diseño experimental	57
Caracterización de la comunidad endofítica	57
Aislamiento de endofitos	57
Identificación de los endofitos	60
Análisis moleculares y filogenéticos	61
Caracterización molecular	61
Análisis filogenético	62
Análisis de parámetros químicos de suelo	63
Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento vegetal	63
Análisis de hongos rizosféricos	65
Análisis de hongos solubilizadores de P, patógenos y biocontroladores	65
Análisis de la colonización de raíces por hongos micorrícicos arbusculares (HMA)	65
Análisis estadístico	66

1.4 Resultados	68
Caracterización de la comunidad endofítica asociada a <i>Jatropha curcas</i>	68
Análisis moleculares y filogenéticos	70
Análisis de parámetros químicos de suelo	74
Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento vegetal	78
Análisis de hongos rizosféricos	80
Análisis de hongos de suelo	80
Análisis de la colonización micorrícica	83
1.5 Discusión	86
CAPÍTULO 2: Procesos de retroalimentación en <i>Jatropha curcas</i>	93
Abreviaturas del capítulo 2	95
2.1 Introducción	97
2.2 Objetivos e hipótesis	100
2.3 Materiales y métodos	101
Área de estudio	101
Material vegetal	101
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	102
Diseño experimental	103
Fase acondicionamiento de las macetas	104
Fase respuesta	105
Corroboración del estatus endofítico de las plantas de primera generación	107
Análisis de parámetros químicos del suelo	107
Análisis de Biomasa y parámetros de crecimiento vegetal	108
Análisis de hongos rizosféricos	109

Análisis de hongos solubilizadores de P, patógenos y biocontroladores	109
Análisis de la colonización de hongos micorrizicos arbusculares (HMA)	110
Análisis estadístico	110
2.4 Resultados	112
Caracterización de la comunidad endofítica asociada a <i>Jatropha curcas</i> en la fase de acondicionamiento	112
Análisis de los parámetros químicos del suelo	115
Análisis de los parámetros de suelo estandarizados (T1-T0)	115
Análisis de los parámetros de suelo de T1 (fase de acondicionamiento)	116
Análisis de los parámetros de suelo de T2 (fase respuesta)	119
Análisis de suelos donde se cultivó <i>Jatropha curcas</i> como planta de segunda generación	120
Análisis de suelos donde se cultivó <i>Jacaranda mimosifolia</i> como planta de segunda generación	123
Análisis de biomasa y crecimiento vegetal de las plantas en la fase respuesta (Segunda generación de plantas: <i>Jatropha curcas</i> y <i>J mimosifolia</i>)	127
Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento de <i>Jatropha curcas</i> en T2	127
Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento de <i>Jacaranda mimosifolia</i> en T2	132
Análisis de hongos rizosféricos en T2 (fase respuesta)	136
Análisis de las UFC rizosféricas asociadas a <i>Jatropha curcas</i>	137
Análisis de las UFC rizosféricas asociad a <i>Jacaranda mimosifolia</i>	139
Análisis de la colonización micorrícica en T2 (fase respuesta)	141
Análisis de micorrizas en <i>Jatropha curcas</i>	141
Análisis de micorrización total	141

Análisis de arbusculos	142
Análisis de vesículas	142
Análisis de coils	143
Análisis de micorrizas en <i>Jacaranda mimosifolia</i>	144
Análisis de micorrización total	144
Análisis de arbusculos	145
Análisis de vesículas	145
Análisis de coils	146
2.5 Discusión	147
CAPÍTULO 3: <i>Alternaria</i>: endofito de <i>Jatropha curcas</i> con potencial rol como bioinoculante fúngico, en el marco de una agricultura sustentable	155
Abreviaturas del capítulo 3	157
3.1 Introducción	152
3.2 Objetivos e Hipótesis	161
3.3 Materiales y métodos	163
Área de estudio	163
Material vegetal	163
Selección de la cepa de <i>Alternaria</i> para su potencial uso como bioinoculante	163
Primer paso: 14 cepas de <i>Alternaria</i>	164
Segundo paso: 4 cepas de <i>Alternaria</i>	164
Tercer paso: Evaluación del crecimiento de <i>Alternaria</i> en medios de cultivo adicionados con <i>J curcas</i>	165
Cuarto paso: Estudio preliminar del efecto de <i>Alternaria</i> sobre el crecimiento de plántulas de <i>Cucumis sativus L</i>	166

Preparación del inóculo	168
Selección del método de inoculación	169
Evaluación de cepas <i>Alternaria</i> como agente de promoción de la micorrización y desarrollo vegetal en <i>Cucumis sativus</i> .	171
Establecimiento de los tratamientos	171
Análisis de la eficacia de la infección endfítica	172
Análisis de micorrización en <i>Cucumis sativus</i> L.	173
Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento vegetal de <i>Cucumis sativus</i> L.	174
Análisis fologenéticos y moleculares	174
Caracterización molecular	174
Análisis filogenético	175
Análisis estadístico	175
3.4 Resultados	176
Selección de la/s cepa/s para su uso como bioinoculante	176
Paso 3: Evaluación del crecimiento de <i>Alternaria</i> en medios de cultivo adicionados con <i>Jatropha curcas</i>	176
Paso 4: Estudio preliminar del efecto de <i>Alternaria</i> sobre el crecimiento de plántulas de <i>Cucumis sativus</i> L.	178
Selección del método de inoculación	179
Evaluación de la cepa de <i>Alternaria</i> como agente de promoción de la micorrización y desarrollo vegetal	180
Análisis de la eficacia de la infección endofítica	180
Análisis de micorrización en <i>Cucumis sativus</i> L.	181
Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento de <i>Cucumis sativus</i> L.	182

Análisis moleculares y filogenéticos	187
3.5 Discusión	188
CAPÍTULO 4: Estudio óptico de la actividad de biospeckle en hojas de <i>Jatropha curcas</i>	
<i>L. Una evaluación no invasiva e indirecta de la colonización de endofitos foliares</i>	193
Abreviaturas del capítulo 4	195
4.1 Introducción	196
4.2 Objetivos e hipótesis	199
4.3 Materiales y métodos	200
Material vegetal	200
Área de estudio	201
Estatus endofítico	201
Diseño experimental	202
Preparación de las macetas	202
Análisis de la infección y colonización micorrícica	202
Análisis preliminares para la determinación de la edad en que las plantas llegan a su máxima infección endofítica	202
Caracterización de la comunidad endofítica	203
Identificación de endofitos	204
Análisis de la biomasa y parámetros de crecimiento vegetal	204
Análisis de datos de Biospeckle	205
Configuración óptica	207
Procesamiento de imágenes	209
Análisis estadístico	210
4.4 Resultados	211

Análisis de la colonización endofítica	211
Análisis de endofitos de las plantas utilizadas para medir LSBA	212
Análisis de la actividad laser biospeckle LBSA	213
Análisis de correlación de variables	215
Análisis multivariado	216
4.5 Discusión	221
Capítulo 5: <i>Discusión y conclusiones generales</i>	225
5.1 Discusión general	226
5.2 Conclusiones generales	227
Anexo	231
Anexo fotográfico del capítulo 1	233
Anexo fotográfico del capítulo 2	241
Anexo fotográfico del capítulo 3	245
Anexo fotográfico del capítulo 4	249
Anexo estadístico y filogenético del capítulo 1	253
Anexo estadístico del capítulo 2	283
Anexo estadístico y filogenético del capítulo 3	329
Anexo del capítulo 4	355
Referencias	361

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción General

Comprender cómo funcionan y se organizan nuevos ecosistemas agrícolas es una necesidad para asegurar un manejo integrado y sustentable de los cultivos. En este sentido, las especies utilizadas para la generación de biocombustible, como cultivos de segunda generación, es decir, aquellas especies no-alimentarias destinadas específicamente a la producción de biomasa para usos energéticos (Robledo & Correal, 2013), resultan un desafío emergente. Especies de este grupo, empleadas a nivel mundial, están comenzando a ser cultivadas en este país (Rozemberg *et al.*, 2009; Paterlini *et al.*, 2019; Nikas *et al.*, 2022; Canabarro *et al.*, 2023), es por esto que investigaciones en ámbitos regionales, donde su cultivo es factible, aportan conocimientos para promover el aumento de la eficiencia de manejo y, mitigar o prevenir problemas ambientales derivados de su implantación. Este es el caso de *Jatropha curcas* L, una especie que ha despertado un gran interés en los últimos años, pero cuyas características agronómicas aún no están totalmente entendidas (Carels, 2013; Du *et al.*, 2019; Che Hamzah *et al.*, 2020; Singh *et al.*, Riayatsyah, 2022). Por ejemplo, a pesar de su potencial para la producción de biodiésel, *Jatropha curcas* ha sido clasificada como invasora en algunos países, como Australia, USA y Sudáfrica, y el riesgo de invasión asociada a este cultivo raramente es considerado en las políticas sobre biocombustibles (Kashe *et al.*, 2020). Por lo tanto es necesario una evaluación de los riesgos que representa el cultivo de esta especie, basada en evidencia científica, para luego poder tomar las decisiones políticas más acertadas.

***Jatropha curcas* L.**

Descripción del género

Jatropha curcas L. es un árbol o arbusto (0,50-4 m de alto) glabro. Pecíolos (4-15 cm) delgados. Lámina orbicular-ovada (5-11 X 5-11 cm), casi entera, o más comúnmente 3-5-lobada, aguda, glabrescente, pubescente sobre las nervaduras en la cara inferior; base 5-nervada, anchamente cordada. Estípulas pequeñas. Cimas pedunculadas más cortas que las hojas, pedúnculos y pedicelos pubescentes; brácteas lanceoladas (± 5 mm). Flores amarillo-verdosas. Flores masculinas con sépalos ovados, elípticos (± 4 mm), obtusos, poco pubescentes, casi libres. Pétalos soldados, elípticos (± 6 mm), interiormente lanosos, mayores que el cáliz. Disco de 5 glándulas libres. Estambres 10 en dos ciclos, los exteriores casi libres, los interiores monadelfos, glabros. Flores femeninas con los sépalos poco soldados, elípticos, agudos (6-8 mm). Pétalos elípticos, agudos (8-9 mm), pubescentes interiormente. Disco de 5 glándulas libres. Ovario glabro, subgloboso; estilos 3; estigmas bífidos, papilosos. Cápsula grande (± 3 cm long.). Semillas (18-20 mm long.) gruesas, oblongas, negruzcas, reticuladas (Smith et al., 1988). (Fig I.1)



Figura 1: Árboles de *Jatropha curcas* en una plantación para la producción de alimento para ganado en México Fuente: <https://www.elsitioavicola.com/articulos/2229/la-jatropha-como-nuevo-recursos-para-alimentar-ganado/>

El fruto de *Jatropha curcas* es una cápsula drupácea y ovoide crustáceo leñosa, de 2.5 a 4 centímetros de largo por 2 centímetros de ancho (Fig. 2). Inicialmente son de color verde, pero al madurar van cambiando al amarillo, hasta volverse de color café oscuro o negro. La planta de *Jatropha curcas* puede producir varias cosechas durante el año si la humedad de la tierra es buena y las temperaturas son suficientemente altas. El desarrollo del fruto necesita aproximadamente 90 días desde la floración hasta que madura la semilla (Oyuela Sandino et al., 2012)

El crecimiento de los tallos presenta una discontinuidad morfológica, debido a que, en cada incremento, dicho crecimiento no es uniforme. La corteza es de color verde amarillenta, pálida y casi lisa, delgada como papel, con desprendimientos en tiras horizontales.



Figura I.2: Frutos y semillas de *Jatropha curcas*. Autora de la foto: Annah Ngobeni (Moshobane et. al., 2017).

Distribución

Originario de América Central y México, este arbusto perenne cuenta con cerca de 175 especies, ampliamente distribuidas en numerosas zonas tropicales y subtropicales (Fig I.3).

Se trata de una planta que puede ser cultivada en zonas semiáridas, creciendo en tierras marginales y erosionadas, no disponibles para otros cultivos (Carels, 2013). En Argentina *Jatropha curcas* aparece como un cultivo alternativo para algunas regiones de Jujuy, Misiones, Formosa y Santiago del Estero promoviendo el desarrollo local mediante la producción de biodiésel (Falasca & Bernabé, 2006; Falasca et al., 2006; Huerga, 2010; Niella et al., 2012; Beaver et al., 2016).

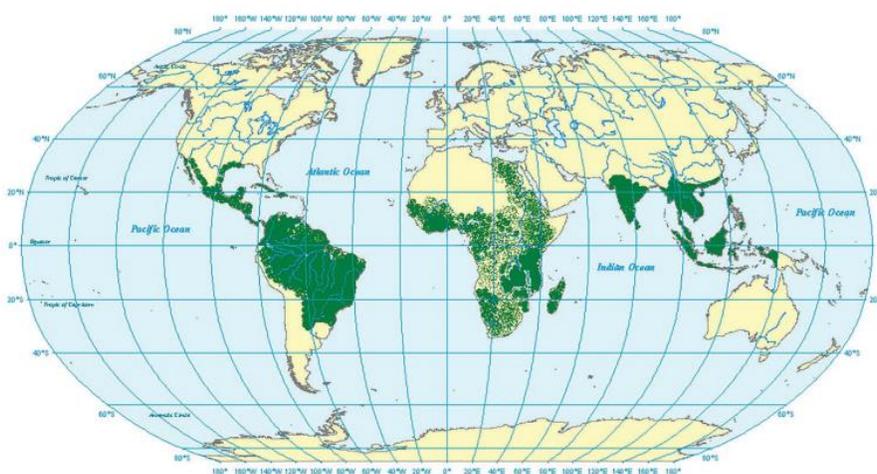


Figura I.3: Posible distribución geográfica mundial de *Jatropha curcas* L. con base en plantaciones reportadas (Herrera 2020).

Aplicaciones

La semilla se utiliza principalmente para la extracción de aceite y a partir de este, además de biodiésel, se pueden producir lubricantes, combustible para iluminación o jabones de usos cosméticos. También se le atribuyen propiedades medicinales como antisifilítico, purgante, uso externo en lesiones dérmicas, eficaz contra parálisis, reumatismo y ciática, controla la retención de líquidos, y es estimulante en el crecimiento del cabello. Por su contenido de ésteres de forbol se puede utilizar en la elaboración de biopesticidas. También de las semillas

se extrae curcina, compuesto que tendría propiedades antitumorales (Oyuela Sandino et al., 2012).

El árbol de *Jatropha curcas* es ampliamente utilizado en la construcción de cercos vivos para potreros, cultivos agrícolas, solares, etc. También aporta calidad y permite la recuperación de suelos marginales o en procesos de desertización; mejorando la captación y retención de aguas de lluvia. Otros usos importantes son la producción de abonos orgánicos, medicina, pesticidas (insecticida, molusquicida, rodenticida, repelente). Además, es tutor de otros cultivos, por ejemplo, la vainilla; y, en asociación con otras especies forestales, sirve como barrera rompe vientos para la protección de cultivos. Del tallo se extrae un látex que contiene jatrofina, el cual posee propiedades anticancerígenas. Este látex ha sido utilizado en el control de hemorragias producidas por heridas. El látex posee taninos que son usados como colorantes de textiles ya que produce una mancha color café que es casi indeleble. También se utiliza como bioinsecticida muy efectivo. La madera no es buena como combustible (Saldarriaga Zambrano & Zambrano Zambrano, 2014).

Las hojas contienen un aceite color amarillo con potente acción antihelmíntica, también es usado en tratamientos externos en úlceras. Tienen propiedades anti-inflamatorias, sirven como abono orgánico, protección del suelo y de retención de humedad en el suelo, y es eficaz como pesticida natural (Oyuela Sandino et al., 2012).

En la India ha sido utilizado como antídoto en mordeduras de serpientes. Por otro lado, la cocción de hojas y raíces es útil para las diarreas. A nivel de suelo contribuye al control de la erosión y mejora la captación y retención de aguas lluvia.

La pulpa del fruto se puede usar como fuente calorífica para la cocción de alimentos, en la producción de biogás o como abono orgánico (Gutierrez & Santos, 2013).

***Jatropha curcas* como cultivo energético**

La utilización de cultivos energéticos como una fuente renovable de combustibles es un concepto de gran relevancia desde una mirada ecológica y económica en la actualidad, a escala tanto local (nacional) como global (Kashe et al., 2020). Más del 95% de los cultivos que actualmente están siendo utilizados para la elaboración de biodiésel son limitados debido a su potencial rol de alimento tanto para humanos como para animales (Takase et al., 2015; Simon & Hülsbergen, 2021; Šurić et al., 2022). En este escenario, el uso de aceites no comestibles es una alternativa.

Debido a sus características, *Jatropha curcas* se ha convertido en uno de los cultivos oleaginosos más promovido como cultivo de segunda generación para la producción y el desarrollo de tecnologías de biodiésel (Parawira, 2010; Oyuela Sandino et al., 2012; Singh et al., 2021). Además, es un cultivo adecuado por su rápida y eficiente domesticación comparado con otras especies arbóreas (Achten et al., 2010).

El biodiésel de *Jatropha curcas* tiene una densidad comparable, mayor viscosidad y menor poder calorífico que el combustible diesel. Sumado a esto, su estabilidad a la oxidación es mayor que la del biodiésel de soja y colza (Singh et al., 2021).

Debido a que no puede ser utilizado para alimentación, a su fácil propagación y a su resistencia a la sequía, *Jatropha curcas* se considera como materia prima y su utilización como biocombustible reduce las emisiones de CO₂ a la atmósfera (Mohammed et al., 2014). Sus adaptaciones a diversas condiciones agroclimáticas, en particular a condiciones

ambientales desfavorables, están relacionadas a su fitness ecológico que puede ser resultado, en parte, de la presencia de hongos endofíticos (Rodríguez et al., 2009).

Endofitos fúngicos

El término "endofito" fue introducido por De Bary en 1866 (De Bary, 1886), como cualquier organismo habitando un tejido vivo. Más tarde en 1995, Wilson introduciría una de las definiciones más aceptadas para estos endofitos fúngicos definidos como hongos que viven asintómicamente dentro de los tejidos vegetales sanos durante al menos parte de su ciclo de vida. Hoy sabemos que los endofitos pueden ser encontrados en tejidos de casi todos los linajes de plantas, comprendiendo una enorme riqueza específica (Fröhlich & Hyde, 1999; Arnold & Herre, 2003). Rodríguez y colaboradores (2009) caracterizaron a los endofitos fúngicos en dos grandes grupos, los clavicipitaceos, que afectan a algunas gramíneas, y los no clavicipitaceos que pueden recuperarse de tejidos de plantas no vasculares, helechos y afines, coníferas y angiospermas. Adicionalmente, reconocieron dentro de los no clavicipitaceos tres categorías diferenciadas según: rango de plantas hospedantes que abarca (estrecho o amplio), tejido/s colonizado/s (vástago, rizoma, raíz), rango de colonización dentro de la planta (sistémica o localizada), biodiversidad en planta (baja, alta, no conocida), tipo de transmisión (vertical, horizontal), beneficios para su fitness (adaptado o no adaptado al ambiente). Esta clasificación se puede apreciar en la tabla 1.

En particular, los endofitos clase III son un grupo diverso y polifilético, compuesto principalmente de especies del filo *Ascomycota* (Arnold & Lutzoni 2007). Algunos estudios han demostrado que este grupo de hongos puede modular la ecología de las comunidades vegetales confiriendo resistencia al estrés abiótico y biótico (Herre et al., 2007; Mejía et al.,

2008; Rodríguez et al., 2009; Yuan et al., 2011; Abo Nouh, 2019; Aamir et al., 2020; Kamran et al., 2022).

Tabla I.1: Criterio para caracterizar las clases de endofitos (Rodríguez et al., 2009)

Criterio	Clavicipitaceos		No clavicipitaceos	
	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
Rango de hospedante	Estrecho	Amplio	Amplio	Amplio
Tejido(s) colonizado(s)	Vástago y rizoma	Vástago, raíz y rizoma	Vástago	Raíz
Colonización en planta	Sistémica	Sistémica	Localizada	Sistémica
Biodiversidad de plantas	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión	Vertical	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Beneficios adaptativos	NAH	AH y NAH	AH	NAH

NAH: no adaptados al hábitat, AH: adaptados al hábitat

Los roles ecológicos de este grupo de endofitos recién comenzaron a ser dilucidados a comienzos del siglo XXI así como la naturaleza de las interacciones entre las plantas y sus endofitos foliares (Herre et al., 2007; Mejía et al., 2008). Sin embargo, en los últimos años, se ha prestado cada vez más atención a este grupo de endofitos, especialmente a los asociados a plantas leñosas, realizándose grandes avances en el entendimiento de su rol en los ecosistemas y de su aporte de beneficios a las plantas que los hospedan (Tejesvi & Pirttilä, 2018; Jia et al., 2020; Kamran et al., 2022 entre otros). Algunos de los beneficios que estos organismos otorgan a la planta hospedante se detallan a continuación:

- Otorgan resistencia contra la herbivoría, debido a que producen toxinas (como rugulosina, HA-chlorohidrina, pyrenophorol, entre otras) pudiendo ser utilizados como biocontroladores (Jia et al., 2020, Rizali & Wahdah, 2020).

- Modularían el crecimiento vegetal, por ejemplo, incrementando significativamente el largo de vástago, entrenudos y hojas, además de aumentar los pigmentos fotosintéticos en ciertas especies vegetales (Khan et al., 2016).
- Mediarían en los mecanismos para la absorción y distribución del nitrógeno dentro de la planta (Christian et al., 2019).
- Otorgarían protección contra los rayos UV en plantas de ambientes extremos, como la Antártida (Barrera et al., 2020).
- Alteran significativamente los perfiles químicos de sus hospedantes, por lo que funcionarían como una unidad funcional en la defensa de las plantas (Tejesvi & Pirttilä, 2018).
- Representan un recurso prometedor con aplicaciones farmacéuticas en terapias medicinales debido a su capacidad para producir compuestos bioactivos. Este efecto se ve amplificado por su abundancia relativa, ya que casi todas las plantas albergan al menos una especie endofítica (Strobel, 2018).
- Endofitos fúngicos asociados a cultivos energéticos podrían ser utilizados como mini fábricas de biodiésel ya que acumulan lípidos en exceso en su biomasa (Paul et al., 2020).

Adicionalmente a estas capacidades, la expresión heteróloga de genes biosintéticos (aquellos que codifican para enzimas de una vía biosintética determinada) también podría ofrecer posibilidades para encontrar nuevos compuestos a partir de cepas endofitos completamente no cultivables (Meng et al., 2022). El desarrollo de sistemas de expresión heterólogos para

hongos endofitos, así como un mayor avance de las herramientas ómicas, como la metagenómica y la metabolómica, muy probablemente proporcionarán innovaciones biotecnológicas basadas en hongos endofitos en el futuro (Tejesvi & Pirttilä, 2018; Meng et al., 2022).

Relaciones de retroalimentación

Los efectos que una planta introduce en un suelo determinado, y que pueden impactar en el crecimiento de plantas que utilizan posteriormente el mismo suelo se conocen como relaciones de retroalimentación planta–suelo (RPS) (Park, 1963; Bever et al., 1997; Bever, 2002; 2003). A través de la hipótesis de RPS, las plantas invasoras pueden cambiar las comunidades microbianas del suelo de tal manera que puedan facilitar el éxito de la invasión de las plantas. Esto puede entonces mediar cambios en la química y las propiedades del suelo, lo que favorece aún más el establecimiento de plantas (Gibbons et al., 2017; Shahrtash & Brown, 2020). Estas relaciones pueden ser positivas o negativas para las plantas (Bever et al., 1997; Ehrenfeld et al., 2005). La dirección de la retroalimentación depende del efecto negativo relativo de la acumulación en el suelo de patógenos, herbívoros y parásitos (Park, 1963; Brown & Gange, 1989; van der Putten, 2007) *vs* los efectos positivos relativos de la acumulación de HMA, bacterias fijadoras de nitrógeno y otros organismos beneficiosos (Allen & Allen, 1984; Garbaye, 1994) y del efecto indirecto de las interacciones de la biota rizosférica-planta sobre las interacciones planta-planta (Bever, 2003). Por estas razones estos cambios pueden incrementar o disminuir el desarrollo vegetal.

Interacciones biológicas y fenómenos de retroalimentación

Los metabolitos secundarios producidos por organismos endofíticos de tejidos aéreos o los compuestos derivados de su interacción con la planta, pueden ser incorporados al suelo a través de los exudados liberados por las raíces o de los tejidos muertos que quedan como detritos, siendo responsables de modular la comunidad de los microorganismos rizosféricos y así afectar el desarrollo de la siguiente, e incluso posteriores generaciones de plantas (Antunes et al., 2008; Albers et al., 2006; Novas et al., 2011a). Estos cambios pueden generar modificaciones que afecten directa o indirectamente la fertilidad del suelo, pueden alterar los parámetros físicos y químicos, incrementar o disminuir la micobiota saprotrófica, y/o ejercer cambios en la diversidad, disminución de especies patogénicas, etc.

Rudgers y Orr (2009) han sugerido que el rol de los endofitos foliares podría ser clave en la modificación de la biota del suelo por parte de las plantas (Reinhart et al., 2006; Rudgers & Orr, 2009; Anaya et al., 2013), y por lo tanto podría modular los efectos de retroalimentación mediados por la comunidad rizosférica. Hay evidencia de que las interacciones de plantas invasoras con endofitos fúngicos foliares, pueden promover el crecimiento de estas plantas sobre las plantas nativas, mejorando su competitividad (Klironomos, 2002; Reinhart & Callaway, 2004, 2006; Aschehoug et al., 2012; Shahrtash & Brown, 2020).

El estudio de las relaciones de retroalimentación mediadas por endofitos fúngicos foliares de transmisión horizontal, en el marco de procesos productivos agrícolas, representa un área casi desconocida, pero muy prometedora (Taghavi et al., 2011, Adeleke et al., 2022; Grabka et al., 2022). Estos procesos han sido estudiados en modelos que involucran endofitos de

transmisión vertical y gramíneas, demostrando promisorios resultados (Padilla et al., 2012; Adeleke et al., 2022 entre otros).

Estudios recientes señalan la importancia crucial de los organismos rizosféricos en el desarrollo de *Jatropha curcas* ya que, por ejemplo, la rizósfera de los cultivos oleaginosos, alberga diversos hongos como los promotores de crecimiento, y hongos micorrícicos arbusculares (HMA), organismos que pueden ser utilizados como bioestimulantes para optimizar la producción de cultivos (Wiriya et al., 2020). En particular *Jatropha curcas* es capaz de albergar una amplia variedad de comunidades endosimbióticas de transmisión horizontal y la composición de estas comunidades es producto del entorno local (Mighell et al., 2019).

En este marco se ha destacado como un “vacío del conocimiento” el estudio de la diversidad endofítica de esta planta, los procesos de colonización involucrados y la interacción entre estos factores y el microbioma rizosférico, considerando esta información como clave para el mejoramiento y desarrollo de cultivos sustentables, así como también para sus potenciales aplicaciones en la industria de biodiésel (Achten et al., 2007; Mohanty et al., 2013; Negussie et al., 2012, 2013; Paul et al., 2020).

Adicionalmente, en el contexto del desarrollo de estrategias para la promoción del desarrollo vegetal en *Jatropha curcas*, es de interés utilizar herramientas que permitan una rápida, precisa y eficaz detección de las infecciones endofíticas establecidas sin tener que recurrir a métodos invasivos/destructivos. Tal es el caso de la actividad de biospeckle láser, o “laser biospeckle activity” (LSBA), que permite detectar actividad física o biológica en tejidos

vegetales *in situ*, sin tener que dañar el tejido en estudio (Braga et al., 2005, Rabelo et al., 2011, Singh et al., 2020b; Zdunek et al., 2014; Singh et al., 2021).

Entender la importancia que tienen los endofitos en la naturaleza, y las potenciales aplicaciones que derivan de las numerosas investigaciones sobre estos organismos, así como estudiar las interacciones que establecen con su entorno resulta de gran interés. De esta manera, se podrá dilucidar el rol que los endofitos fúngicos de transmisión horizontal tienen en procesos de retroalimentación en los ecosistemas nativos.

Hipótesis de trabajo

Como hipótesis general se plantea que la asociación de *Jatropha curcas* con endofitos foliares, modula las comunidades rizosféricas y parámetros de suelo, lo que determina los procesos de retroalimentación.

Las hipótesis de este trabajo consistieron en:

1. *Los endofitos fúngicos modulan diferencialmente la colonización de Jatropha curcas por HMA, y la asociación de Jatropha curcas con comunidades rizosféricas como hongos biocontroladores, hongos solubilizadores de fósforo y hongos fitopatógenos.*
2. *La comunidad endofítica asociada a Jatropha curcas modula la comunidad rizosférica, favoreciendo el establecimiento de procesos de retroalimentación positiva de Jatropha curcas con el suelo.*
3. *Las especies de endofitos foliares con mayor abundancia promueven la colonización radical por HMA y modulan parámetros de crecimiento vegetal.*

4. *Los métodos no invasivos como Láser Biospeckle Activity (LBSA) permiten la detección temprana de infecciones endofíticas en Jatropha curcas.*

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue realizar aportes significativos al conocimiento de los mecanismos de modulación de la comunidad rizosférica mediado por endofitos fúngicos, para el desarrollo de herramientas innovadoras basadas en la manipulación de estos organismos con fines de aplicación agronómica. En particular, este trabajo busca explorar aspectos asociados al desarrollo y mejoramiento de cultivos energéticos y su interacción con endofitos foliares.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo comprendieron:

1. *Caracterizar la comunidad endofítica asociada a hojas de Jatropha curcas.*
2. *Determinar si los endofitos foliares de Jatropha curcas modulan: la colonización de raíces por parte de HMA; la abundancia de hongos biocontroladores, solubilizadores de fósforo, y hongos fitopatógenos seleccionados de la comunidad rizosférica.*
3. *Identificar el tipo de proceso de retroalimentación que Jatropha curcas establece con el suelo.*
4. *Analizar si cepas seleccionadas de endofitos foliares de Jatropha curcas son responsable de las respuestas en el desarrollo y micorrización de otros hospedantes.*

5. *Evaluar la potencialidad del método “Laser Biospeckle Activity” (LSBA) para determinar, de manera no invasiva la colonización de hojas por parte de endofitos foliares.*

CAPÍTULO 1

Comunidad endofítica en *Jatropha curcas*. Impacto en comunidades rizosféricas y parámetros de suelo.

Abreviaturas del Capítulo 1

E+: plantas colonizadas por endofitos ambientales

E-: plantas cubiertas con una barrera (plástico transparente) para evitar la colonización por inóculo ambiental

HMA: hongos micorrícicos arbusculares

s: suelo estéril por tindalización

Ns: suelo no estéril

Ec: conductividad eléctrica

C_T: carbono orgánico total

N_T: nitrógeno total

P_T: fósforo total

1.1 Introducción

Desde hace tiempo se sabe que diferentes factores del suelo pueden promover la disponibilidad de nutrientes y mejorar la productividad vegetal. Dentro de estos factores, probablemente la comunidad rizosférica sea uno de los más relevantes (Chaparro et al., 2012). El entendimiento de los mecanismos de interacción entre las comunidades microbianas del suelo y los procesos de los ecosistemas en los que habitan debe ser abordado como tema prioritario en un contexto donde las malas prácticas agrícolas y el uso del suelo generan efectos adversos sobre la nutrición y desarrollo de las comunidades vegetales.

Por otra parte, la caracterización de las comunidades fúngicas endofíticas ha tomado relevancia mundial, en parte, debido a la gran riqueza que poseen y, en parte por las implicancias ecológicas de las interacciones que establecen, beneficiando el desarrollo vegetal (Frohlich & Hyde, 1999; Arnold et al., 2003, 2007).

En este trabajo se estudiaron las relaciones establecidas entre plantas de *Jatropha curcas* L., los endofitos foliares asociados a la misma, y cómo esta interacción planta-hongo estaría relacionada con: modificaciones en los diferentes parámetros fisicoquímicos del suelo; las características de las comunidades rizosféricas y con el nivel de micorrización de las raíces de la planta estudiada.

Endofitos fúngicos (clase III)

Cómo se ha mencionado en la Introducción general, los endofitos fúngicos se definen como los hongos que viven asintóticamente dentro de los tejidos vegetales durante al menos parte de su ciclo de vida (Wilson, 1995). Dentro de este grupo, aquellos endofitos con

transmisión horizontal (endofitos clase III, según Rodríguez y colaboradores (2009)) constituyen un grupo diverso y polifilético, compuesto principalmente por especies del Phylum Ascomycota (Arnold & Lutzoni, 2007).

Los endofitos fúngicos clase III incluyen una alta diversidad de hongos asociados a plantas no vasculares, plantas vasculares, gimnospermas y angiospermas leñosas y herbáceas en biomas que van desde bosques tropicales hasta comunidades boreales y árticas/antárticas (Carroll et al., 1978; Petrini, 1979; Stone, 1988; Arnold et al., 2000; Gamboa & Bayman, 2001; Tejesvi et al., 2005; Murali et al., 2007; Davis & Shaw, 2008, Rodríguez; et al., 2009; Currie et al., 2014).

Algunos estudios han demostrado que este grupo de hongos juegan un papel primordial a nivel ecológico dado que pueden modular las comunidades vegetales (Herre et al., 2007; Mejía et al., 2008; Yuan et al., 2011), confiriendo resistencia al estrés abiótico y biótico y, por lo tanto, contribuir al establecimiento de especies vegetales mejorando su competitividad (Clay & Schardl, 2002; Redman et al., 2002; Aschehoug et al., 2012; Khan et al., 2016; Rizali & Wahdah, 2020). Además, los endofitos foliares también pueden modular la asociación entre su hospedante y otros simbiontes fúngicos, como los microorganismos rizosféricos (Rudgers & Orr 2009; Anaya et al., 2013).

Considerando el incremento de estudios que apoyan la hipótesis de que las plantas interactúan selectivamente con su microbioma circundante (Rodríguez & Durán, 2020; Suryanarayanan & Shaanker, 2021), resulta prioritario caracterizar a las comunidades endofíticas foliares asociadas a *Jatropha curcas*, planta exótica invasora en un entorno nativo, y las interacciones y procesos que se establecen entre estos organismos y el microbioma asociado a la rizósfera.

Este estudio servirá como un primer paso para dilucidar el rol que los endofitos fúngicos de transmisión horizontal tienen en procesos de retroalimentación en los ecosistemas nativos.

Suelo

El suelo es uno de los factores más importantes que debe ser considerado en estudios acerca del uso de la tierra en los agroecosistemas. La calidad del suelo se ha definido como la capacidad de un suelo de funcionar dentro de los límites del ecosistema, mantener la productividad biológica, mantener la calidad ambiental y promover la salud de las plantas y los animales (Doran & Parkin, 1994). Una buena calidad del suelo es lo que determinará su sostenibilidad (Aon et al., 2001).

Existen diversos parámetros considerados clave para determinar la calidad del suelo, aquellos de naturaleza física y físico-química (estabilidad de agregados, pH, conductividad eléctrica), química (parámetros nutricionales y fracciones de carbono), y aquellos del tipo microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o diversas actividades enzimáticas). El componente microbiológico puede servir como indicador del estado general del suelo, pues una buena actividad microbiana en suelo es reflejo de condiciones fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos (bacterias, hongos, algas) que actúan sobre sustratos orgánicos y cultivos asociados; y constituye un marcador biológico potencialmente útil para evaluar las perturbaciones que puedan presentarse (Ramos Vásquez & Zúñiga Dávila, 2008). Los microorganismos del suelo desempeñan el papel crucial de mantener los principales ciclos de nutrientes en el suelo (C, N, P entre otros) a través del reciclaje de la materia orgánica. Esto último es fundamental no solo para la producción primaria sino también para el

funcionamiento a largo plazo de los ecosistemas (Stevenson, 1986; Doran & Parkin, 1994, 1996:).

Parámetros de suelo

pH

El pH del suelo es probablemente la medida más informativa que se puede obtener para determinar las características del suelo. A simple vista, el pH dice mucho más sobre un suelo que simplemente si es ácido o básico. Por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes esenciales y la toxicidad de otros elementos se pueden estimar por su relación conocida con el pH (Thomas, 1996). En este sentido, el pH influye fuertemente en los factores abióticos, como la disponibilidad de carbono, la disponibilidad de nutrientes, y la solubilidad de los metales. Además, el pH del suelo puede controlar factores bióticos, como la biomasa de hongos y bacterias, tanto en suelos forestales como agrícolas, convirtiéndolo en uno de los factores que más afectan a las comunidades microbianas en el suelo (Rousk et al., 2009).

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) del suelo está relacionada con el total de cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+) o aniones (NO_3^- , SO_4^- , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^- , OH^-) que son solubles en una solución del suelo. Por lo tanto, este factor generalmente ha sido asociado con la salinidad del suelo, sin embargo, también puede servir como medida de nutrientes solubles (Smith & Doran, 1996).

Carbono

Los suelos contienen más carbono (C) que la suma existente en la vegetación y en la atmósfera (Swift, 2001). El C orgánico del suelo se encuentra en forma de residuos orgánicos de vegetales, animales y microorganismos poco alterados, en forma de humus y en formas muy condensadas de composición próxima al C elemental (Jackson, 1964). En condiciones naturales, el C orgánico del suelo resulta del balance entre la incorporación al suelo del material orgánico fresco y la salida de C del suelo en forma de CO₂ a la atmósfera (Swift, 2001), erosión y lixiviación. Bajo condiciones aeróbicas, una parte importante del carbono que ingresa al suelo es lábil, se mineraliza rápidamente y una pequeña fracción se acumula como humus estable. El CO₂ emitido desde el suelo a la atmósfera no sólo se produce por la mineralización de la materia orgánica soluble donde participa la fauna edáfica (organismos detritívoros) y los microorganismos del suelo, sino también se genera por el metabolismo de las raíces de las plantas (Fortín et al., 1996).

El carbono orgánico es esencial para la actividad biológica del suelo. Proporciona recursos energéticos a los organismos del suelo, mayoritariamente heterótrofos, en forma de carbono lábil (hidratos de carbono o compuestos orgánicos de bajo peso molecular). Por otro lado, los organismos de suelo descomponen los residuos orgánicos participando activamente en los ciclos de muchos elementos utilizados por las plantas. Además, los organismos de suelo participan en la formación y estabilización de la estructura y porosidad del suelo (Krull et al., 2002).

Fósforo

Este elemento proviene de las apatitas y depósitos de fosfato natural de donde es liberado a través de procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial como fertilizante. El fosfato liberado paulatinamente de las apatitas lo absorben las plantas y la biomasa microbiana, luego se incorpora en la materia orgánica de los suelos y sedimentos, y nuevamente se deposita en formas minerales poco solubles. El fósforo inorgánico (Pi) se presenta generalmente fuertemente fijado en forma de fosfatos de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), de hierro (FePO_4), de magnesio ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) y de aluminio (AlPO_4), especialmente en arcillas del grupo de las caolinitas y ocluido en los óxidos de hierro y aluminio. Incluso el P, aplicado como fertilizante en forma de superfosfato, puede fácilmente constituir compuestos inorgánicos inutilizables, debido a su inmovilización sobre la materia orgánica y arcillas. La mayoría del fósforo de los ecosistemas terrestres se encuentra localizado en el suelo, generalmente su contenido varía de 100 a 3000 mg de P/kg; entre un 15 y un 80% de dicho contenido está en formas orgánicas (Po), dependiendo de la naturaleza del material, y el grado de precipitación, entre otros. La principal fuente de compuestos orgánicos de fósforo (Po) la constituyen residuos de plantas, animales y microorganismos, que liberan compuestos como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres, lo que representa entre un 30 y un 60% del P total. La mineralización de éstos, retornándolos a fosfatos inorgánicos (Pi), como HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , permite el reciclaje del elemento para que regrese a la biota. La disponibilidad de estos iones está fuertemente influenciada por el pH del suelo y por la adición de fertilizantes (Baran Číková et al., 2007) Las fuentes de fósforo y su distribución son críticas para la sostenibilidad de las prácticas agrícolas (Chen et al., 2008), ya que dicho elemento se requiere para favorecer la formación de semillas, el desarrollo radicular, el vigor en los cereales y la maduración de los cultivos. Las plantas han desarrollado varias estrategias para la adquisición de fósforo bajo limitación de este nutriente (Turner et al., 2003; Bünemann, 2008;), que

incluyen modificaciones morfológicas de la raíz, adaptaciones fisiológicas, alteraciones bioquímicas que promueven asociación con microorganismos micorrícicos y no simbiontes. El ciclo del P, a diferencia del ciclo del nitrógeno, no incluye cambios en la valencia. Los principales procesos en el suelo involucran: la toma del fósforo por las plantas y su retorno a través de los residuos vegetales y animales, reacciones de fijación a las superficies de arcillas y óxidos y el recambio biológico dado por procesos de mineralización-inmovilización y solubilización dependientes de la actividad microbiana (Stevenson & Cole, 1999). La principal contribución a la dinámica del fósforo en los suelos está dada por el recambio de los procesos de mineralización-inmovilización microbianos (Richardson et al., 2011), que poseen un papel esencial especialmente en la rizósfera. Estos procesos están influenciados por una combinación de factores como las especies vegetales, el tipo de suelos y los factores ambientales. Los microorganismos que colonizan la rizósfera pueden excretar ácidos orgánicos que incrementan la solubilidad del P y enzimas con actividad fosfatasa que hidrolizan mono, di y tri ésteres de fosfato, junto con las asociaciones micorrícicas que son críticas en la disponibilidad para muchas plantas, estas últimas utilizan una combinación eficiente de translocación del P acompañada de actividades fosfatasa y fitasa (Rincon & Gutierrez, 2012). Se puede decir que las asociaciones microbianas que incrementen la eficiencia en la disponibilidad del P para las plantas son beneficiosas desde el punto de vista económico y ambiental para el desarrollo de sistemas agrícolas.

Nitrógeno

El nitrógeno (N) es el principal nutriente que limita el crecimiento de las plantas en los ecosistemas terrestres, y la transformación del nitrógeno inerte a formas que pueden ser

asimiladas por las plantas está mediada por los microorganismos del suelo (Moreau et al., 2019). Dado que la mayor parte del N en la atmósfera se encuentra en forma inerte, N₂, que las plantas no pueden utilizar directamente, el N se convierte en un factor limitante para el crecimiento vegetal. Sin embargo, las plantas han desarrollado múltiples estrategias para hacer frente a la limitación de N mediante la asociación con comunidades microbianas que reciclan este elemento (Moreau et al., 2019).

Para los sistemas agrícolas la incorporación de nitrógeno es esencial para la fertilidad del suelo y por tanto para la productividad vegetal (Cerón Rincón & Gutierrez, 2012).

Organismos Rizosféricos

Hongos de la rizósfera (biocontroladores, fitopatógenos y solubilizadores de P) y hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

Las comunidades rizosféricas juegan un rol complejo en muchos aspectos de los ecosistemas del suelo, como interacciones bióticas y ciclo de nutrientes. La composición de la microbiota rizosférica puede influir positiva o negativamente a las características de las plantas (Miao et al., 2015). Ciertos hongos de suelo benefician a las plantas mediante la solubilización de micronutrientes (fósforo, zinc o potasio), la producción de reguladores de crecimiento (auxina, giberelinas, citoquinina y etileno), sideróforos, antibióticos, o síntesis de enzimas que lisan la pared celular (Devi et al., 2020; Boro et al., 2022). Inversamente, las plantas hospedantes son capaces de modular su propio microbioma rizosférico, ajustando la arquitectura de las raíces y/o factores ambientales como el pH y nutrientes (Miao et al., 2015).

Algunos de los hongos que hacen que un suelo sea considerado de buena calidad pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, hongos con capacidad de disolver fósforo inorgánico permitiendo que el mismo este biodisponible para las plantas (Doilom et al., 2020; Larekeng et al., 2020). A su vez, hongos del género *Trichoderma* son utilizados como agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos (Abdullah et al., 2021). En el caso opuesto, hongos del género *Fusarium* son considerados fitopatógenos (causante de varias enfermedades en cultivos de interés agronómico) por lo que su presencia en el suelo puede constituir una alerta sobre la calidad sanitaria del mismo (López-Bautista et al., 2020; Khan et al., 2021).

La gran mayoría de las plantas terrestres han desarrollado diferentes asociaciones mutualistas con hongos y bacterias en la rizósfera. La forma más extendida de simbiosis vegetal involucra hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pertenecientes al Phylum Glomeromycota (Parniske, 2008).

Estos son considerados microorganismos beneficiosos y desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la fertilidad y la salud del suelo a largo plazo. A cambio de los fotosintatos de las plantas, los HMA facilitan la absorción y transferencia de nutrientes minerales, como fósforo (P), nitrógeno (N), azufre, potasio, calcio, cobre y zinc, desde el suelo a sus plantas hospedantes por medio de micelio extraradicular que se extiende desde las raíces colonizadas hacia el suelo (Smith & Read, 2010; Giovannini, et al., 2020).

Los endofitos pueden modular parámetros del suelo, como, por ejemplo, cambios en las funciones de las comunidades microbianas del suelo, en su estructura y en su composición de glomalina (una glicoproteína producida abundantemente en las hifas y esporas de los

HMA en suelo y raíces) (Buyer et al., 2011). Los mecanismos responsables de dichos cambios pueden incluir efectos alelopáticos, lixiviación o translocación de metabolitos secundarios a las raíces (Antunes et al., 2008). Existe un creciente cuerpo de investigación que examina las interacciones simultáneas y múltiples dentro de un solo hospedante para lograr una perspectiva integradora de los sistemas biológicos. Se sabe desde principios de la década de 1990 que los endofitos de gramíneas (con transmisión vertical) pueden afectar a los HMA (Chu-Chou et al., 1992; Guo et al., 1992). La importancia en el entendimiento de estos procesos radica en que los mismos afectan a las comunidades fúngicas que contribuyen al desarrollo de las plantas. A partir de estos estudios se ha postulado que las interacciones directas que ocurren entre simbiontes funcionalmente diferentes (Stanton, 2003), a menudo resultan en la promoción de procesos clave que benefician al crecimiento y salud de la planta (Larimer et al., 2010, 2014).

Importancia de este estudio

La demanda mundial de biodiésel se ha incrementado en los últimos años, intensificando el interés por nuevos cultivos oleaginosos. *Jatropha curcas* es la especie más estudiada a nivel mundial dado que sus semillas cumplen con los estándares mínimos para la producción de este biocombustible (Aranda Rickert et al., 2011; Wassner et al., 2012). Teniendo en cuenta el aprovechamiento económico de *Jatropha curcas*, se están impulsando estudios a lo largo del mundo con el objetivo de ampliar el conocimiento respecto de esta especie. Por ejemplo, en Argentina, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), ha desarrollado un proyecto específico sobre *Jatropha* en el marco del Programa Nacional de Bioenergía (Consejo Agropecuario del Sur, 2009) (Mansilla et al., 2021). A su vez, investigadores de la

Universidad Nacional de San Luis (San Luis, Argentina) en conjunto con investigadores de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina) realizaron estudios sobre semillas de *Jatropha curcas* indicando que, gracias a su alto contenido de azúcares y proteínas, tendrían un mejor proceso de germinación en zonas marginales, como la provincia de La Rioja, y además, debido a su alto contenido de ácidos grasos, sus semillas son ideales para la industria de biodiésel (Travecchio et al., 2019).

Si bien existen registros de las interacciones establecidas entre *Jatropha curcas* y endofitos fúngicos de transmisión horizontal (Mighell et al., 2019), y con HMA (Wiriya et al., 2020), sigue siendo escaso el conocimiento de estas asociaciones fúngicas y poco se sabe sobre cómo estas interacciones pueden impactar en el desarrollo vegetal. Por lo tanto, resulta de interés estudiar las comunidades fúngicas asociadas a plantas de esta especie y su posible impacto en el suelo y sus comunidades fúngicas.

Este trabajo pretende ser un aporte al conocimiento de esta especie, desde el enfoque de las interacciones que esta planta establece con los microorganismos de su entorno, tanto en el ambiente circundante como en el suelo en que es cultivada, poniendo énfasis en los endofitos fúngicos de transmisión horizontal (Clase III) y los hongos que habitan en la rizósfera, junto con HMA.

1.2 Objetivos e Hipótesis

La hipótesis de este capítulo fue:

Los endofitos fúngicos modulan diferencialmente la colonización de Jatropha curcas por HMA, así como la asociación del Jatropha curcas con comunidades rizosféricas como hongos biocontroladores, hongos solubilizadores de fósforo y hongos fitopatógenos.

En base a la hipótesis planteada, las predicciones que se pusieron a prueba son: i) mayor abundancia de hongos biocontroladores, de solubilizadores de P y hongos micorrícicos arbusculares en la rizósfera de plantas E+. ii) menor abundancia de hongos potencialmente patógenos en la rizósfera de plantas E+.

Los objetivos particulares de este capítulo fueron:

- 1. Caracterizar la comunidad endofítica asociada a hojas de Jatropha curcas.*
- 2. Determinar si los endofitos foliares de Jatropha curcas modulan: la colonización de raíces por parte de HMA; la abundancia de hongos biocontroladores, solubilizadores de fósforo, y hongos fitopatógenos seleccionados de la comunidad rizosférica.*

1.3 Materiales y Métodos

Área de estudio

Los experimentos realizados en el presente estudio fueron llevados a cabo en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (34° 32' 31" S, 58° 26' 24" W, altitud 9 m, Buenos Aires-Argentina) entre los meses de

noviembre de 2013 y abril de 2014. Las condiciones ambientales de la región se caracterizan por precipitaciones anuales promedio de 1040 mm, siendo Julio el mes más seco, con precipitaciones de 59 mm y el mes más húmedo es marzo, con precipitaciones de 115 mm. La temperatura anual promedio es de 18.32°C. (datos obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional de Argentina).

Material vegetal

Las semillas de *Jatropha curcas* utilizadas para los ensayos subsiguientes fueron donadas por el Ingeniero agrónomo Diego Wassner (Cátedra de Cultivos Industriales, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina). Las mismas fueron recolectadas de lotes experimentales situados en Siete Palmas, provincia de Formosa, Argentina (25° 13' 21.04"S, 58° 17' 59.67"W).

Estatus endofítico

Con el objetivo de estudiar las comunidades endofíticas y su relación con las variables que serán descritas más adelante en detalle (parámetros de suelo, biomasa vegetal, comunidades rizosféricas, micorrización) se definieron dos estatus endofíticos de las plantas de *Jatropha curcas*: -plantas que se mantuvieron expuestas al medio ambiente para que fueran colonizadas por los endofitos ambientales constituyeron el estatus **E+**, y -plantas que fueron cubiertas con un plástico transparente, con el fin de minimizar la colonización natural de endofitos ambientales, constituyeron el estatus **E-**.

Para conseguir plantas E- las macetas fueron cubiertas con una capa de polyvinyl chloride (PVC, o comercialmente conocido como plástico cristal) de tal manera que se minimizara la colonización endofítica. Dicha capa de plástico presentó unos cm de separación con el suelo de manera de permitir una buena aireación y que la temperatura en el interior de esta fuera similar a la del exterior. Para el estatus E+, las macetas se mantuvieron descubiertas, es decir sin la cobertura de plástico transparente (Fig. 1.1).

Todas las plantas se mantuvieron en bandejas según las condiciones previamente descritas, durante 5 meses aproximadamente. Durante el transcurso del ensayo, las plantas E+ fueron expuestas al régimen normal de lluvias correspondiente a la época del año, y regadas según necesidad, en épocas de escasas o nulas precipitaciones. El riego de las plantas E- se realizó respetando y reproduciendo el régimen de lluvias y riegos al que estuvieron expuestas las plantas E+.

Preparación de las macetas

Los ensayos se realizaron en macetas de 5 litros. Se utilizaron 250 dm³ de suelo comercial (TerraFertil S.A.) dividido en dos sets de 20 macetas, uno de los cuales se tinalizó (durante una hora, proceso que se repitió tres días consecutivos) mientras que el otro se mantuvo sin tinalizar. De esta manera se definió “s” al suelo estéril y “Ns” al suelo no estéril (ver sección “diseño experimental”). La tinalización del suelo se realizó para minimizar las posibles infecciones endofíticas que pudieran producirse por inóculos presentes en el suelo, como ha sido reportado en otros trabajos (Suryanarayanan & Vijaykrishna, 2001). A su vez, cada set de macetas (s o Ns) se dividió en dos partes para establecer el tratamiento E+ o E-. Como

resultado, cada tratamiento contó con 10 macetas. Se sembraron 3 semillas de *Jatropha curcas* L. en cada maceta y cuando las plantas alcanzaron los 5 cm de altura se eligió la que estuviera en mejores condiciones, descartando las otras dos, asegurando de esta manera la presencia de una planta por maceta (Fig. 1.1).

Diseño experimental

El diseño experimental de esta etapa del trabajo consistió en un diseño factorial de 2x2 completamente aleatorio. Los factores principales fueron

- i- Estatus endofítico: las plantas infectadas con endofitos se nombraron **E+**, y las plantas libres de endofitos, **E-**.

- ii- Tratamiento de suelo: el suelo estéril se denominó **s**, y el suelo no estéril se denominó **Ns**.

La combinación de estos factores principales resultó en cuatro tratamientos, realizándose 10 réplicas por tratamiento (Fig. 1.1).

Caracterización de la comunidad endofítica

Aislamiento de endofitos

Con el fin de caracterizar a la comunidad fúngica endofítica, se analizaron semillas y hojas de *Jatropha curcas*. Para evaluar el tipo de transmisión que poseen estos endófitos, 100

semillas fueron desprovistas de sus cubiertas seminales, y ambas partes (cubierta seminal y semilla sin cubierta seminal) fueron esterilizadas superficialmente (2 min en etanol al 70%, 8 min en solución de lavandina 65 g/lit al 50%, y 1 min en etanol al 50%). Cada muestra fue colocada en placas de Petri de 90 mm con medio agarizado MEAch (extracto de malta OXOID y agar BRITANIA al 2%, adicionado con cloranfenicol SIGMA-ALDRICH 10 mg/lit).

Con el objetivo de aislar hongos endofíticos foliares, 5 plantas de cada tratamiento fueron seleccionadas al azar. De cada una de las 5 plantas se extrajeron 3 hojas al azar y de cada una de ellas se cortaron 10 fragmentos circulares con un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro. Cada fragmento fue lavado y esterilizado superficialmente por inmersión según la siguiente secuencia: 1 min. en etanol al 70%, 2 min. en solución de lavandina 65 g/lit al 4%, y 30 seg. en etanol al 50%. Cada fragmento fue transferido luego a placas de Petri de 90 mm con medio MEAch. Un total de 600 fragmentos fueron analizados, 150 por tratamiento.

Las placas (tanto de fragmentos de hojas como de semillas) fueron incubadas a 24°C y examinadas periódicamente luego de las primeras 24 hs de incubación. En el momento en que los fragmentos/semillas presentaron crecimiento fúngico, el micelio en desarrollo fue recuperado y transferido a placas de Petri de 60 mm con MEAch. Luego se realizaron los repiques y controles necesarios para obtener cultivos puros. Los mismos fueron almacenados a 4 °C en heladera para su estudio posterior.

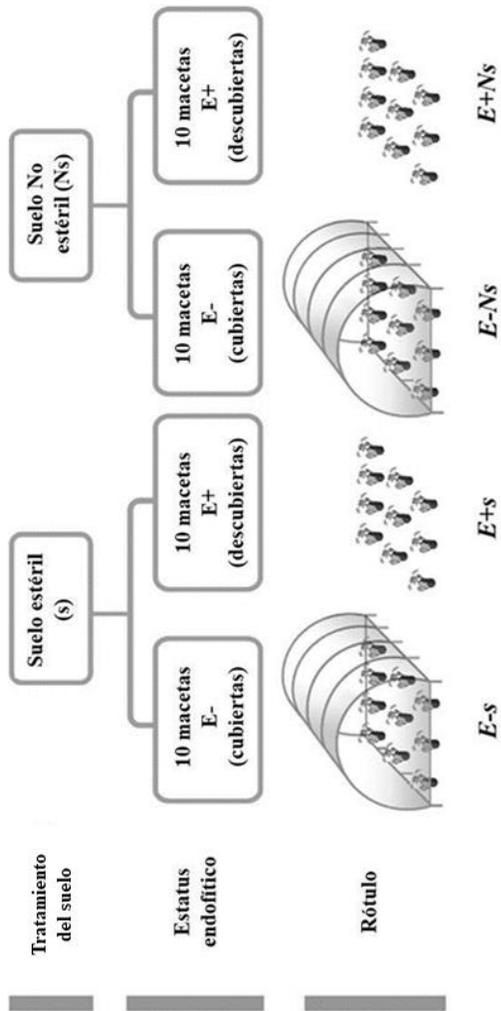


Figura 1.1: Esquema representativo de la distribución de las plantas de *Jatropha curcas* por tratamiento de suelo (Suelo No estéril: Ns, Suelo estéril: s) y estatus endofítico (plantas con endofitos: E+, plantas sin endofitos: E-).

Identificación de los endófitos.

Con el fin de identificar morfológicamente los endofitos foliares de *Jatropha curcas*, todos los aislamientos fueron sub-cultivados en MEAch o APGch (agar BRITANIA al 2%, infusión de papa al 0.4%, glucosa al 2% adicionado con cloranfenicol SIGMA-ALDRICH 10 mg/lit). Las cepas puras fueron examinadas periódicamente hasta su esporulación, y en primera instancia, fueron asignadas a morfotipos de acuerdo con las características macroscópicas de las colonias y luego, de acuerdo a las características microscópicas y morfología de las esporas o conidios. Las observaciones fueron realizadas en microscopio óptico (Olympus-BX41), a partir de material fresco, montado en agua destilada, KOH al 5%, reactivo de Mezler o Floxina (según las características del cultivo). Las medidas microscópicas fueron tomadas con el programa Infinity Analyze v6.4 (Lumenera Corporation). Las identificaciones taxonómicas fueron realizadas usando las claves taxonómicas apropiadas (Ellis 1971 y 1976; Sutton, 1980; Lacap et al, 2003). Aquellas cepas que no hubieran esporulado fueron cultivadas en cámara a 24°C expuestas a luz UV y oscuridad en ciclos de 12 hs, con el fin de promover la esporulación.

Una vez que fueron identificadas todas las cepas para cada tratamiento se calculó, por un lado, la frecuencia de aislamientos de cada especie (FA), en función al total de fragmentos analizados, y por otro lado el porcentaje de aislamientos (PA) que presenta una especie dada, en función al total de aislamientos endofíticos de ese tratamiento, según las siguientes fórmulas:

FA (Frecuencia de aislamientos por género) = (Número de fragmentos con aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados) * 100

PA (Proporción de aislamientos) = (Número de aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados por hoja) * 100

A su vez se calculó el porcentaje de aislamiento total de cada tratamiento (AT) en función de los aislamientos totales de todos los tratamientos según la siguiente fórmula:

AT= (número de aislamientos endofítico de cada tratamiento/ número de aislamientos totales) *100

Análisis moleculares y filogenéticos

Caracterización molecular

De las cepas recuperadas, se eligieron 22 que fueron las que presentaron mejores condiciones de crecimiento de entre todos los tratamientos, para corroborar su identificación mediante métodos moleculares. El DNA genómico se extrajo exitosamente de 14 cepas, utilizando el Ultra Clean TM Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Solana Beach, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La región ITS (internal transcribed spacer) de dichas cepas se amplificó utilizando los primers universales ITS1 e ITS4, bajo las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización a 94°C por 3 min., 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg., renaturalización a 57°C por 45 seg., extensión a 72°C por 1 min. y

extensión final a 72°C por 7 min. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 50 µl conteniendo solución buffer para PCR 10 mM, suministrada por el fabricante, 50 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 10 mM de cada primer, 1 U de ADN recombinante Taq polimerasa (Invitrogen, Brazil) y 3 µl de ADN genómico fúngico. La purificación del producto de PCR y la secuenciación de los fragmentos se llevaron a cabo por Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

Análisis filogenético

Las reconstrucciones filogenéticas para las identificaciones moleculares, se realizaron utilizando Máxima Parsimonia (MP). Los datos utilizados para el análisis fueron construidos con las secuencias obtenidas en este trabajo, y secuencias altamente similares de acuerdo a la búsqueda con BLAST en el GenBank (NCBI). Todas las secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos fueron publicadas por taxónomos expertos o depositadas en colecciones de cultivos, y están listadas en la sección **Anexo estadístico y filogenético del capítulo 1**. Se utilizaron secuencias tipos, cuando estas estaban disponibles.

Las secuencias de este estudio fueron alineadas con las secuencias de referencia seleccionadas utilizando BioEdit v.7.0.5.3 Hall (1999) y depositadas en el GenBank bajo los siguientes números de acceso: **KR780623, KR780620, KP702153, KP702152, KP702154, KP702148, KP702149, KR780622, KP702150, KR780618, KR780616, KR780619, KP702151, KP702155, KP702160, KP702161, KP702159, KR780621, KP702157, KP702158, KR780617 y KP702156**. Los costos asignados fueron 15 por gap openings y 6 por gap extensions. Los datos se analizaron utilizando NONA v.2.0 (Goloboff 1997) por el

método de MP. A todos los caracteres se les dio el mismo peso, y los gaps se consideraron como datos faltantes. Se utilizaron 2000 repeticiones y un máximo de 10000 árboles. Para determinar el soporte de cada clado, se realizaron análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. Una secuencia de *Amanita muscaria* (AB096052) se eligió como outgroup.

Análisis de parámetros químicos del suelo

Los parámetros químicos del suelo se analizaron a partir de tres muestras por tratamiento, cada una compuesta por una mezcla (pool) de 3 fracciones de suelo tomados al azar provenientes de tres macetas diferentes. Para cada muestra se analizaron los siguientes parámetros: carbono orgánico total (Ct) (Walkley & Black 1934), nitrógeno total (Nt) (Bremner & Mulvaney 1982), fósforo total (Pt) (Bray and Kurtz 1945), conductividad eléctrica (EC) (Bower & Wilcox 1965) y pH (1:2.5 H₂O). Los análisis de suelo se realizaron en los laboratorios del Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS – CONICET) en Buenos Aires, Argentina.

Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento vegetal.

Luego de los 5 meses de comenzado el ensayo, se cosecharon 5 plantas de cada tratamiento. Se registró el peso fresco de vástago (PFV) y raíz (PFR) de cada ejemplar, y luego las muestras se secaron en estufa a 60°C. Cabe señalar que los tallos y hojas de *Jatropha curcas* son muy carnosos, por lo que el tiempo en el que se obtuvo el peso seco constante de toda la planta fue de 15 días.

Análisis de hongos rizosféricos

Análisis de hongos solubilizadores de P, patógenos y biocontroladores

Con el fin de analizar la calidad del suelo presente en cada uno de los tratamientos, se eligieron los siguientes géneros de hongos como indicadores de calidad: *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., como potenciales solubilizadores de fósforo; *Trichoderma* spp., como potencial biocontrolador y *Fusarium* spp., como potencial patógeno.

Al momento de la siembra de *Jatropha curcas* (T0) y al momento de la cosecha de las plantas (T1), se tomaron muestras de suelo de todos los tratamientos para analizar la abundancia de cepas correspondientes a dichos hongos. La abundancia se determinó como el número de unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas a partir de una dilución de suelo inoculada en placa. Para determinar la dilución óptima para ambos tratamientos (s y Ns) se realizó una curva de calibración mediante el método de diluciones sucesivas: partiendo de una suspensión de suelo (1:10, g suelo: ml de H₂O), la misma se diluye sucesivamente hasta llegar a una concentración que es elegida como patrón para realizar los aislamientos y analizar las poblaciones fúngicas (Ranganayaki et al., 2006). En ambos casos, s y Ns, la dilución óptima resultó ser 1:10000 (g suelo: ml de H₂O).

Una vez realizada la curva de calibración y seleccionada la dilución óptima, 5 macetas de cada tratamiento fueron seleccionadas al azar para la evaluación cuantitativa de los grupos de hongos que se mencionaron anteriormente: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, y *Fusarium*. De cada dilución de suelo rizosférico proveniente de cada maceta seleccionada,

0.1 ml se distribuyeron de manera homogénea, con la ayuda de un rastrillo bacteriológico de vidrio o espátula de Digrafsky, sobre placas de Petri de 90 mm conteniendo MEACh, como medio general, y sobre placas conteniendo medios selectivos como se indica a continuación: las cepas de *Fusarium* se aislaron utilizando el medio SFA (selective *Fusarium* agar, Leslie & Summerell 2006); las cepas de *Trichoderma* se aislaron utilizando el medio TSM modificado (*Trichoderma selective* media, Elad et al., 1981), y para aislar *Aspergillus* y *Penicillium* se utilizó el medio DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol, Pitt & Hocking 2009). Todas las cepas se identificaron mediante la observación de las características morfológicas microscópicas de los conidios.

Las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* recuperadas en DRBC, se caracterizaron luego según su capacidad de solubilizar fósforo. Para este análisis las cepas se cultivaron en placas de Petri conteniendo NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate), medio que se utiliza como indicador de la capacidad de solubilización. La formación de un halo translúcido alrededor de la colonia después de 5 días de incubación indicó la capacidad solubilizadora de P (Wakelin et al., 2004).

Para cada tipo de medio, general y selectivos, se realizaron 5 réplicas proveniente de cada dilución y de cada maceta.

Análisis de la colonización de raíces por hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

El nivel de colonización de las raíces de *Jatropha curcas* por parte de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), fue estimado en 5 plantas de cada tratamiento, elegidas al azar, al

momento de la cosecha (T1). Las raíces de cada planta seleccionada se lavaron con agua corriente para remover restos de suelo, cortadas en secciones de 1 cm y preservadas individualmente en tubos Falcon conteniendo FAA (formol: 10%, ácido acético glacial: 5%, Etanol: 50% y agua destilada: 35%). Luego, las raíces de cada planta se tiñeron con Trypan Blue (Phillips & Hayman, 1970) para poder evaluar la colonización micorrícica. Se analizaron un total de 30 fragmentos de 1 cm de largo de cada raíz. El porcentaje de colonización por parte de los HMA se estimó utilizando el método de Mc Gonigle et al. (1990).

Análisis estadístico

Para analizar las diferencias observadas entre las frecuencias de los aislamientos endofíticos de los diferentes tratamientos se realizó un ANOVA de dos factores ($p < 0.05$). Los factores principales fueron: tratamiento del suelo (Ns y s) y estatus endofítico (E+ y E-). Todas las comparaciones de a pares fueron realizadas utilizando la prueba de Tukey HSD.

Las diferencias en los parámetros químicos del suelo en el T0 (suelo estéril, s; vs suelo no estéril Ns) se analizaron por el test no paramétrico de Kruskal Wallis, mientras que, los tratamientos en el T1 se evaluaron mediante ANOVA de dos factores ($p < 0.05$). Los factores principales fueron: tratamiento del suelo (Ns y s) y estatus endofítico (E+ y E-). Los datos del T1 se estandarizaron con las medias observadas en T0, siguiendo la siguiente fórmula: $(x_i/x_{T0}-1)$, donde x_i es el valor de las variables medidas a T1 y x_{T0} son las medias registradas en T0. En este análisis, los valores negativos reflejaron un decrecimiento en los parámetros

entre T0 y T1. Todas las comparaciones de a pares se realizaron utilizando la prueba de Tukey HSD.

Los resultados de la biomasa de las plantas se analizaron utilizando ANOVA de dos factores ($p < 0.05$) donde los factores principales fueron: tratamiento del suelo (Ns y s) y estatus endofítico (E+ y E-). Todas las comparaciones de a pares se realizaron utilizando la prueba de Tukey HSD.

Para analizar las diferencias en el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) y en el total de colonización micorrícica obtenidas, solo se tuvieron en cuenta los tratamientos donde se utilizó suelo Ns. Los análisis se realizaron a través de un modelo lineal general (GLM) siguiendo una distribución de Poisson usando el paquete lme4 de R. Los factores principales fueron el estatus endofítico (E+/E-) y los medios de cultivo usados para los aislamientos (MEA, SFA, TSM y DRBC). Se evaluaron los supuestos. Como los datos mostraron más variación que la implícita en la distribución de Poisson, se modeló la sobredispersión utilizando la distribución binomial negativa, una aproximación útil para modelar distribuciones marginales de datos de conteo independientes en análisis basados en verosimilitud. El ajuste del modelo se comparó utilizando el criterio de información de Akaike (AIC). Para evaluar el efecto de la interacción entre el estatus endofítico y los medios de cultivo sobre la riqueza de *Penicillium*, definida como el número de UFC, se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) ajustados por máxima verosimilitud con distribución de Poisson. Las macetas se consideraron como una variable aleatoria en los análisis GLMM. El ajuste del modelo se comparó utilizando AIC. El paquete Multcomp se utilizó para realizar comparaciones a posteriori entre los tratamientos con la prueba de Tukey.

No fue posible realizar este análisis con los otros hongos rizosféricos (*Aspergillus*, *Fusarium*, P-solubilizers, *Trichoderma*) debido al bajo recuento de UFC. En estos casos, las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante la prueba de χ^2 .

En todos los análisis se chequearon los supuestos y todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico InfoStat software 2011 (Di Rienzo et al. 2011) y R studio versión 4.1.2

1.4 Resultados

Caracterización de la comunidad endofítica asociada a *Jatropha curcas*.

A partir de los ensayos con semillas esterilizadas superficialmente, tanto de las cubiertas seminales como de las semillas sin las cubiertas seminales, no se obtuvieron aislamientos endofíticos.

En el caso de los análisis de hojas, a partir de 600 fragmentos se obtuvo un total de 75 cepas de endófitos, correspondiendo a 12 géneros diferentes (Tabla 1.1 y Fig. 1.2). Los porcentajes de colonización endofítica más altos (97.33%) se recuperaron de las plantas E+, siendo el porcentaje más alto el correspondiente al tratamiento NsE+ (52 cepas, AT= 69.33 %), seguido del tratamiento sE+ (21 cepas, AT=28%). En el caso de las plantas E-, no se obtuvieron aislamientos a partir de plantas del tratamiento sE-, sin embargo, 2 cepas (AT=2.67%) se obtuvieron a partir de plantas del tratamiento Ns E-. El análisis de la varianza mostró diferencias significativas debido al estatus endofítico ($F=17.29$, $p=0.0007$), aunque las diferencias observadas debido al tipo de suelo (s o Ns) no resultaron ser significativas ($F=$

3.74, $p=0.071$). Tampoco se detectó interacción significativa entre los 2 factores (estatus endofítico y tipo de suelo).

El género más abundante registrado fue *Alternaria*, presente en los tratamientos NsE+ y sE+, seguido de *Bipolaris* y *Nigrospora*, presentes en los tratamientos Ns E+ y Ns E-. El resto de los géneros registrados fueron *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Pseudocercospora*, *Trichurus* y la especie *Phyllosticta capitalensis*

Tabla 1.1: FA (Frecuencia de aislamientos por género) = (Número de fragmentos con aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados) * 100

Género	Tratamiento			
	NsE+	NsE-	sE+	sE-
<i>Alternaria</i>	5.83	0.00	1.83	0.00
<i>Aspergillus</i>	0.17	0.00	0.00	0.00
<i>Bipolaris</i>	0.50	0.00	0.17	0.00
<i>Cladosporium</i>	0.17	0.33	0.00	0.00
<i>Colletotrichum</i>	0.17	0.00	0.00	0.00
<i>Epicoccum</i>	0.00	0.00	1.00	0.00
<i>Micelia sterilia</i>	0.67	0.00	0.00	0.00
<i>Nigrospora</i>	0.50	0.00	0.00	0.00
<i>Phoma</i>	0.17	0.00	0.00	0.00
<i>Phyllosticta</i>	0.17	0.00	0.00	0.00
<i>Pseudocercospora</i>	0.00	0.00	0.17	0.00
<i>Trichururs</i>	0.33	0.00	0.33	0.00

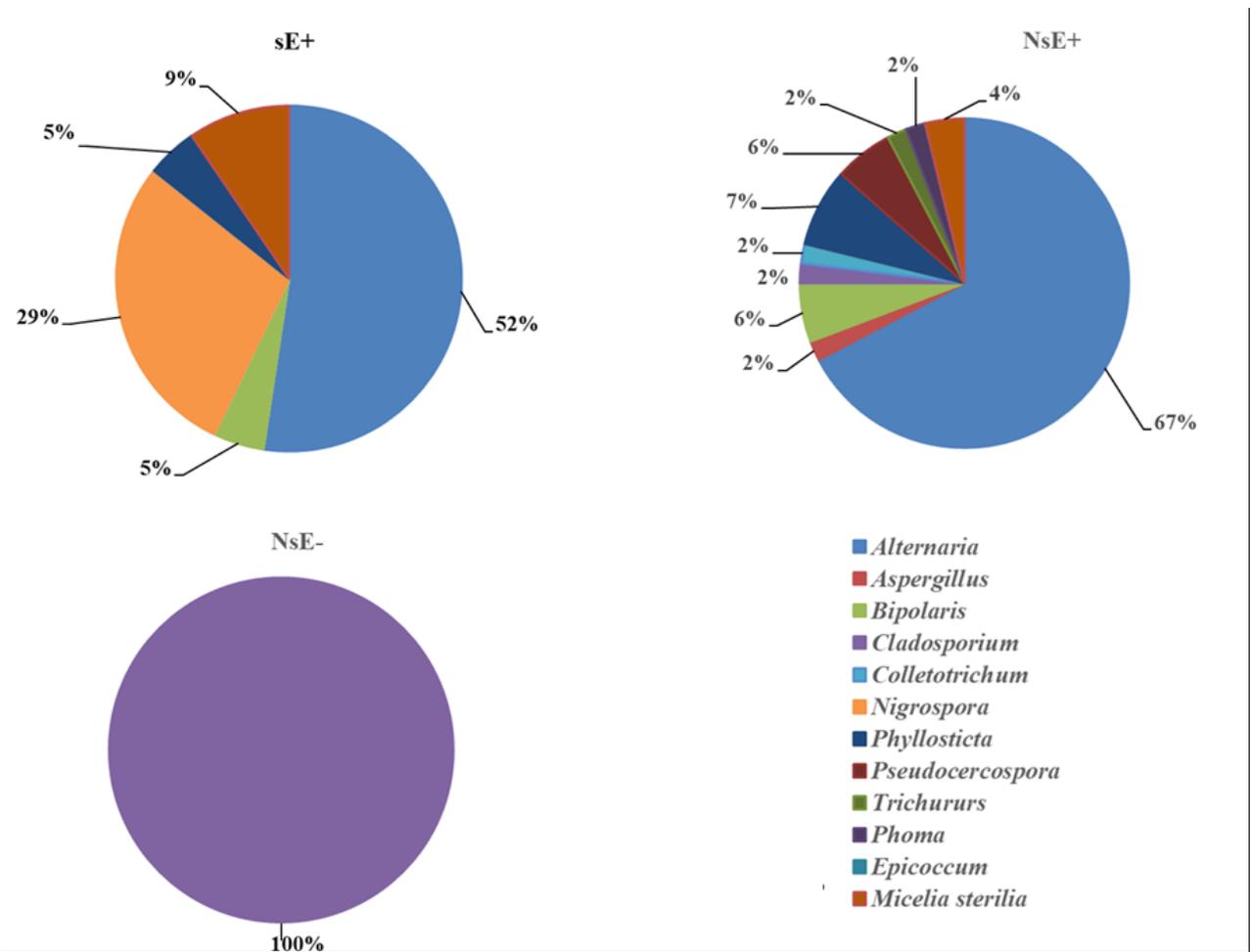


Figura 1.2: Diversidad de géneros endofíticos aislados a partir de hojas de *Jatropha curcas*, obtenidas de los diferentes tratamientos, expresada en porcentaje [PA (Proporción de aislamientos) = (Número de aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados por hoja) * 100]; plantas E+ de suelo no estéril (Ns E+), plantas E- de suelo no estéril (Ns E-), y plantas E+ de suelo estéril (s E+). No se registraron aislamientos de endofitos a partir de plantas E- de suelo estéril (E s -).

Análisis moleculares y filogenéticos

A continuación, en la figura 1.3 se muestra el árbol obtenido a partir del análisis filogenético realizado, utilizando el criterio de optimización de máxima parsimonia utilizando NONA v.2.0 (Goloboff 1997), incluyendo las 22 cepas que fueron caracterizadas molecularmente, y

un set de 157 secuencias, incluyendo el outgroup. Se observa que la cepa NsE+31 pertenece al género *Phoma*, la sE+22, al género *Epicoccum*, las cepas NsE+ 14, NsE+21 y NsE+16 pertenecen al género *Bipolaris*, las cepas NsE+ 3, NsE+4, NsE+30, NsE+ 8, NsE+13, NsE+ 1 y NsE+ 15 pertenecen al género *Alternaria*, la cepa NsE+ 25 pertenece al género *Aspergillus*, la cepa NsE+12, al género *Cladosporium*, las cepas NsE+7 y NsE+10 pertenecen al género *Pseudocercospora*, las cepas NsE+9 y NsE+24, al género *Phyllosticta*, las cepas sE+20 y sE+19 pertenecen al género *Nigrospora*, la cepa NsE+6 pertenece al género *Trichurus* y la cepa NsE+5 pertenece al género *Colletotrichum*.

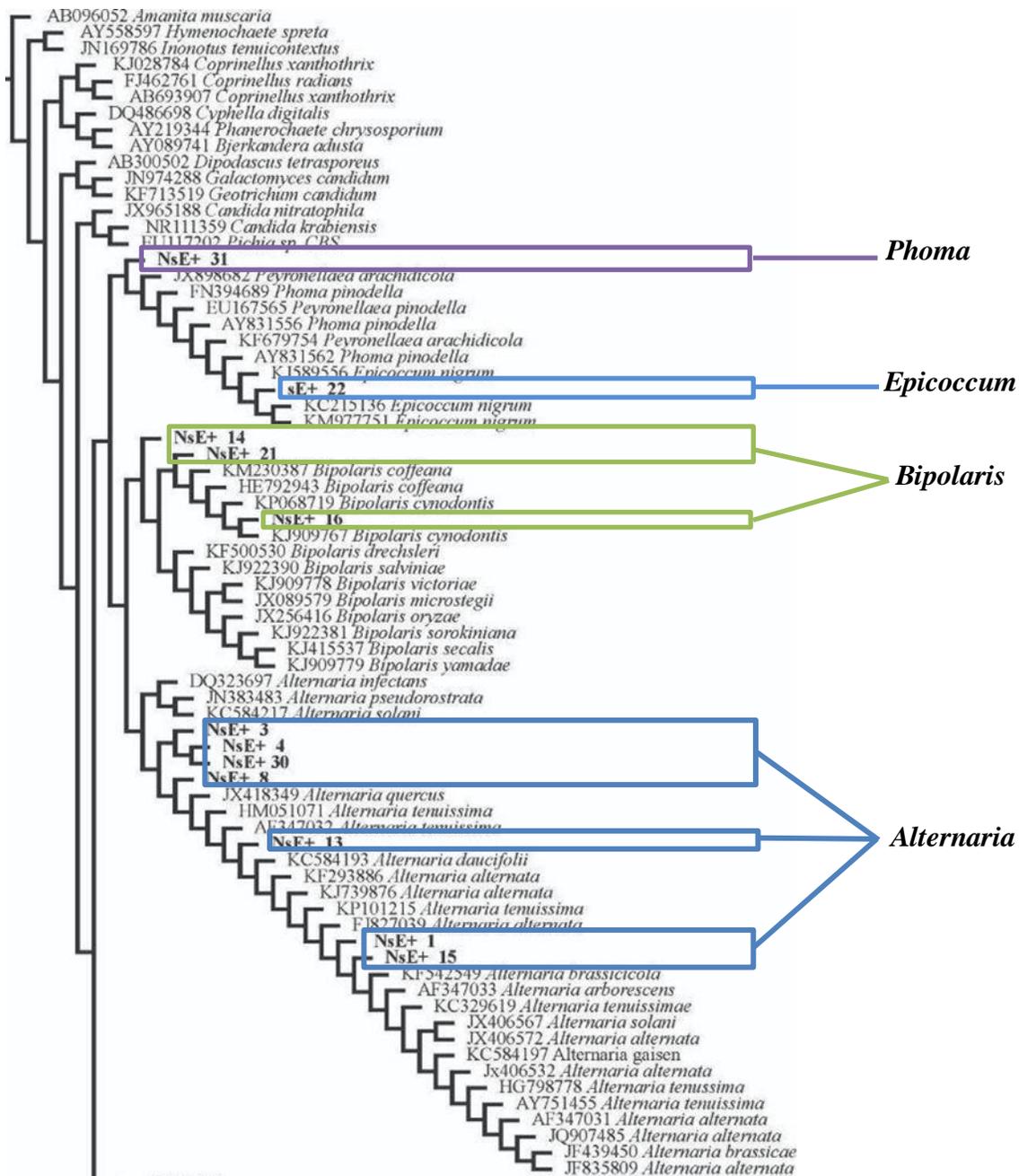


Fig. 1.3 a) Árbol obtenido a partir del criterio de optimización de Máxima Parsimonia (regla de mayoría del 50%) basado en la región ITS/ITS2 producto de un set de datos de 157 secuencias. A continuación, las cepas con sus respectivos números de acceso al GenBank: **NsE+ 31(KR780623)**, **sE+22 (KR780620)**, **Ns E+14 (KP702153)**, **NsE+21 (KP702152)**, **NsE+16 (KP702154)**, **NsE+3 (KP702148)**, **NsE+4 (KP702149)**, **NsE+30 (KR780622)**, **NsE+8 (KP702150)**, **NsE+13 (KR780618)**, **NsE+1 (KR780616)**, **NsE+ 15 (KR780619)** (continúa en pág. siguiente).

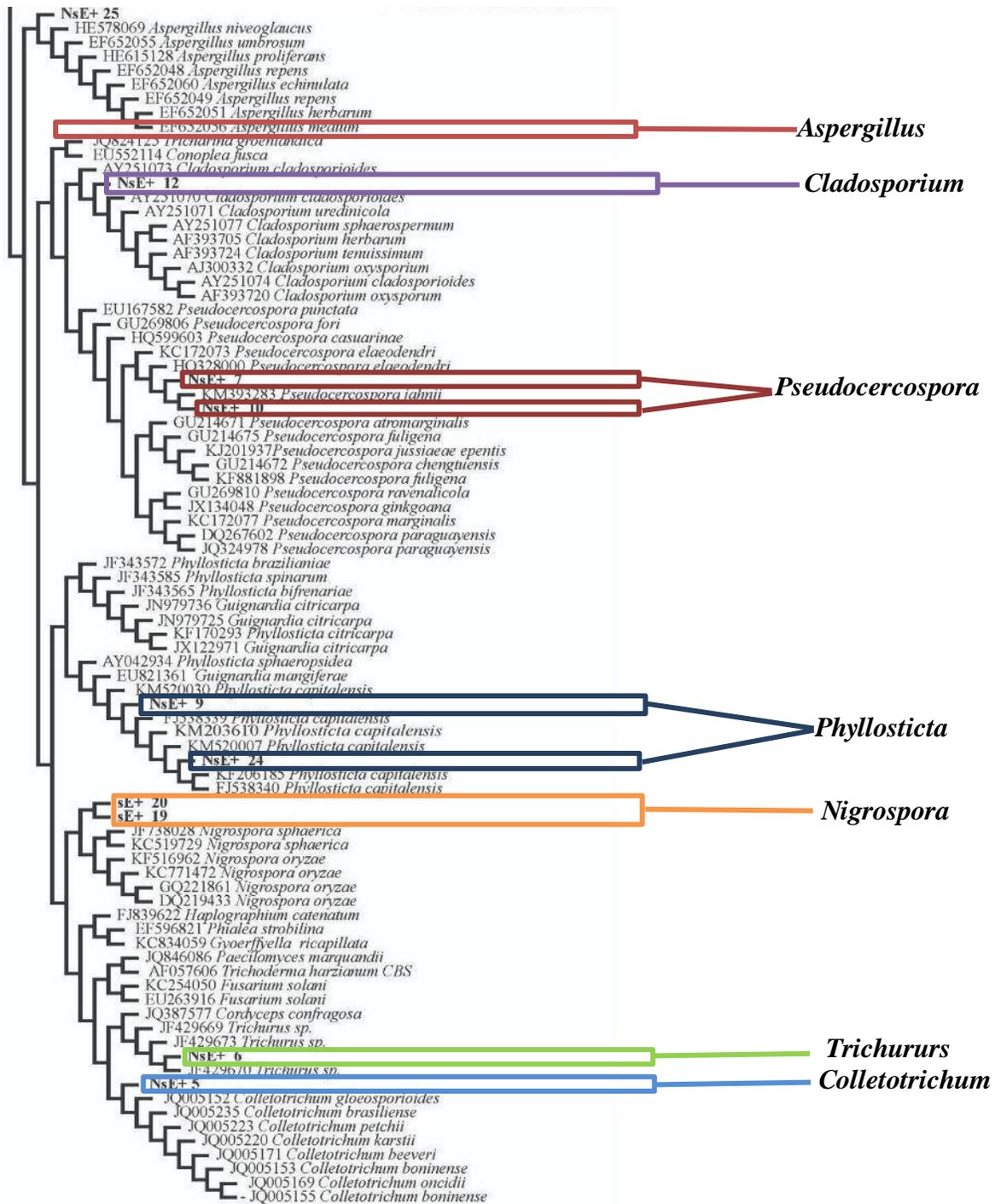


Fig. 1.3 b) Árbol (continuación): NsE+25 (KP702151), NsE+12 (KP702155), NsE+7 (KP702160), NsE+10 (KP702161), NsE+9 (P702159), NsE+24 (KR780621), SE+20 (KP702157), SE+19 (KP702158), NsE+6 (KR780617) y NsE+5 (KP702156).

Análisis de parámetros químicos de suelo

Los datos obtenidos de los análisis de los parámetros químicos de suelo, en el T0 se encuentran resumidos en la Tabla 1.2. Mientras que la esterilización del suelo por tinalización provocó un descenso significativo en el pH ($H_{pH}=4.09$, $p_{pH}=0.04$) en comparación con el suelo no estéril, el resultado opuesto fue obtenido para el carbono total (C_t), nitrógeno total (N_t) y fósforo total (P_t) ($H_{C_t}=0.05$, $p_{C_t}=0.85$, $H_{N_t}=3.86$, $p_{N_t}=0.05$, $H_{P_t}=3.86$, $p_{P_t}=0.05$). No se observaron diferencias significativas en los valores de CE ($H_{CE}=0.05$, $p_{CE}=0.83$)

Los parámetros obtenidos entre tratamientos en T1 fueron analizados luego de su estandarización con los valores medios de T0 (Fig. 1.4).

El análisis de pH muestra que existen diferencias significativas entre todos los factores y en su interacción ($F_E=156.80$, $p_E<0.0001$; $F_S=532.51$, $p_S<0.0001$; $F_{E \times S}=12.80$, $p_{E \times S}=0.007$). Los valores de pH en el T1 fueron menores en suelo estéril registrándose los mayores valores para el tratamiento NsE+.

Los valores obtenidos para la conductividad eléctrica (CE) fueron menores en T1 que en T0. Se observaron diferencias significativas en la conductividad eléctrica (CE), entre los tratamientos E+ y E- ($F_E=47.07$, $p_E=0.0001$) siendo los valores de E+ significativamente menores a los obtenidos para E-, mientras que no se observaron diferencias significativas con respecto al tratamiento del suelo ($F_S=1.74$, $p_S=0.22$) ni a la interacción de los factores ($F_{E \times S}=0.03$, $p_{E \times S}=0.88$).

No se observaron diferencias significativas en los valores de C_T ni en N_T , aunque si se observó en el caso de C_T que los valores obtenidos a partir de muestras de suelo E^- , fueron mayores a los obtenidos a partir de muestras E^+ , y para el caso de N_T , se observó que los mayores valores fueron obtenidos de suelos sE^- .

Los valores de P_T en los tratamientos con suelo no estéril (N_s) fueron significativamente menores que en los tratamientos con suelo estéril (s) ($F_s= 23.29$, $P_s= 0.003$), siendo el tratamiento N_sE^+ en el que se obtuvieron los valores menores.

Tabla 1.2: Comparación de los parámetros químicos de suelo entre tratamientos con suelo estéril (s) y no estéril (Ns), al comienzo de los experimentos (T0).

T0	pH	CE	C_T	N_T	P_T
Suelo estéril (s)	4.97±0.058 ^a	2.22±2.65 ^a	52.24±2.65 ^a	4.95±0.4 ^a	106.43±35.6 ^a
Suelo No estéril (Ns)	5.63±0.42 ^b	2.23±0.42 ^a	51.36±0.74 ^b	3.90±0.74 ^b	78.83±2.63 ^b

Los valores medios de las columnas (n=3) con la misma letra no son significativamente diferentes (P>0.05). T0, tiempo inicial; CE, conductividad eléctrica; C_T, carbón orgánico total; N_T, nitrógeno total; P_T, fósforo total.

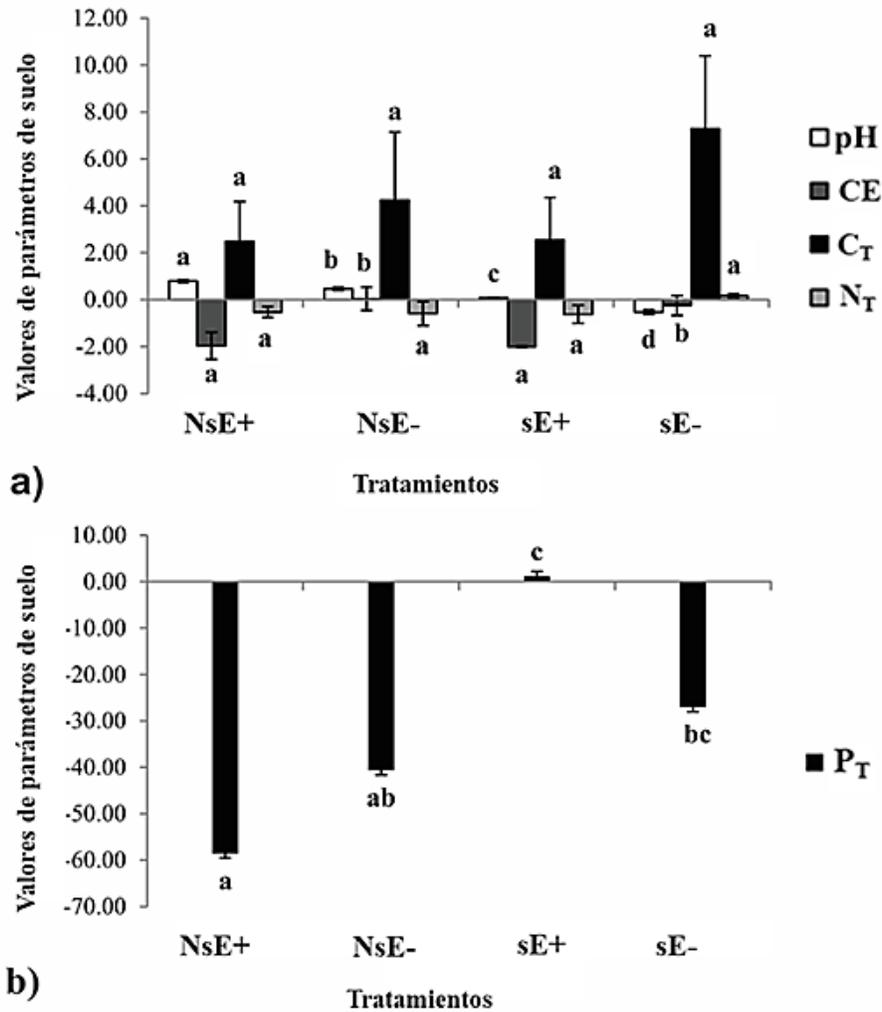


Figura 1.4: Características químicas del suelo. a) Comparación de pH, CE (conductividad eléctrica), Ct (carbono total) y Nt (nitrógeno total) entre tratamientos. b) Comparación de Pt (fósforo total) entre tratamiento. Los valores de Pt se muestran en una figura diferente, debido a que se utiliza una escala diferente. Los valores negativos son consecuencia de la estandarización de los datos a los valores medios de T0. Las unidades de cada uno de los parámetros son: CE, dS m⁻¹; CT, g kg⁻¹; NT, g kg⁻¹; PT, mg kg⁻¹. Los cambios registrados en los parámetros entre T1 y T0 fueron analizados con ANOVA de dos factores y comparados con la prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los parámetros ($P < 0.05$)

Análisis de Biomasa y parámetros de crecimiento vegetal

El análisis de la varianza obtenido para el peso fresco de vástagos (PFV) de *Jatropha curcas* muestra que existen diferencias significativas debido al tratamiento del suelo (Ns o s) ($F = 41.69, p < 0.05$), y al estatus endofítico (E+ o E-) ($F=10.44, p < 0.05$). Las comparaciones de a pares revelan que los valores promedio de PFV fueron significativamente menores para plantas cuyos tratamientos fueron NsE+, con respecto a plantas cuyos tratamientos fueron sE+ o sE-. Los valores promedio de PFV de plantas cuyo tratamiento fue NsE- resultaron significativamente menores a los de plantas sE- (Fig. 1. 5)

Al analizar el peso seco de vástagos (PSV) de *Jatropha curcas* se observa que existen diferencias significativas debido al tratamiento de suelo (Ns o s) ($F= 30.72, p < 0.05$) pero no existen diferencias significativas asociadas al estatus endofítico ni a la interacción de los factores. Las comparaciones de a pares revelan que los valores promedio obtenidos para PSV de plantas cuyo tratamiento fue sE- son significativamente mayores que los valores de plantas cuyo tratamiento fue NsE+, y los valores promedio de PSV de plantas cuyo tratamiento fue sE+ resultaron significativamente mayores que los de plantas NsE- (Fig 1.5).

El análisis de la varianza obtenido para el peso fresco de raíces de *Jatropha curcas* (PFR) mostró que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para PFR debido a los factores suelo (Ns o s) ($F= 13.09, p < 0.05$) y colonización endofítica (E+ o E-) ($F=2.62, p < 0.05$), pero también debido a la interacción de dichos factores ($F=3.11, p < 0.05$). Las comparaciones de a pares revelan que los valores promedio obtenidos para PFR de plantas

cuyo tratamiento fue sE+ o sE- son significativamente mayores que las de plantas NsE+ (Fig 1.5).

Por último, el análisis de la varianza realizado para los valores obtenidos de peso seco de raíces (PSR) de *Jatropha curcas* mostró que existen diferencias significativas asociadas al factor suelo (Ns o s) ($F= 7.98, p<0.05$) y a la interacción de los factores ($F=7.26, p<0.05$). Las comparaciones de a pares revelan que los valores promedio de PSR obtenidos para plantas cuyo tratamiento fue NsE+ son significativamente mayores a los valores obtenidos para plantas sE+ (Fig. 1.5).

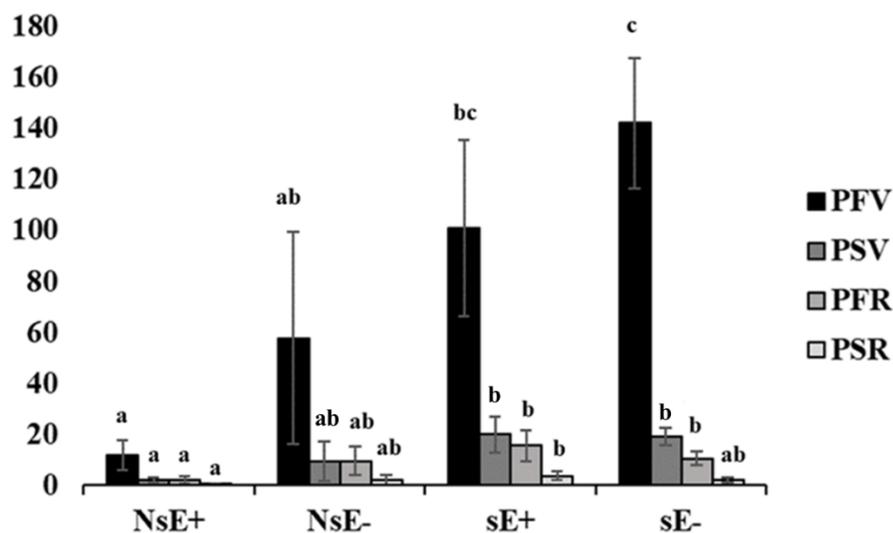


Figura 1.5: Análisis de los valores obtenidos parámetros de crecimiento de vástagos y raíces de *Jatropha curcas* en los diferentes tratamientos. Valores medios \pm error estándar ($n=5$) para plantas crecidas bajo diferentes condiciones: plantas infectadas (E+) o no (E-) con endófitos, crecidas en macetas con suelo no estéril (Ns) o estéril (s). PFV= peso fresco de vástagos, PFR= peso fresco de raíces, PSV= peso seco de vástagos, PSR= peso seco de raíces. Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de dos factores, y las comparaciones se realizaron utilizando la prueba de Tukey. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos para la misma variable ($P = 0.05$)

Análisis de hongos rizosféricos

En este trabajo se estudió el efecto de endofitos foliares sobre diferentes grupos de microorganismos rizosféricos:

1. Hongos solubilizadores de fósforo
2. Hongos potencialmente patógenos
3. Hongos potencialmente biocontroladores
4. Hongos micorrízicos arbusculares (AMF)

Análisis de hongos de suelo

Un total de 464 placas de Petri y 2196 UFC se analizaron para el estudio de los grupos de hongos seleccionados de la rizósfera. Las frecuencias de los hongos rizosféricos asociados a *Jatropha curcas* se estudiaron en cuatro medios de cultivo selectivos: un medio selectivo para cada grupo de hongos (DRBC, TSM y SFA) y MEAch como medio general. Las diferencias en el total de UFC entre tratamientos no fueron significativas debido al estatus endofítico o el medio de cultivo ($Z < 1$, $p > 0.05$). El total de UFC recuperadas en el T0 fueron escasas en comparación con las recuperadas en T1 (Tabla 1.3). Sin embargo, no se recuperaron UFC de las muestras provenientes de suelo estéril a T0, confirmando así que el tratamiento de esterilización resultó exitoso. En la mayoría de los tratamientos, los valores

más altos de UFC se obtuvieron en MEAch, en comparación con los medios selectivos en T1 (Tabla 1.3).

No se observaron diferencias significativas entre el número de UFC de los hongos de rizósfera (sin tener en cuenta los HMA) obtenidas a partir de los tratamientos NsE+ y NsE-, a excepción de *Penicillium*, género del cual se obtuvieron los valores más altos de UFC en el tratamiento NsE+ ($Z= 2.54$, $p < 0.05$). Las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* obtenidas a partir de los medios MEAch y DRBC, se testearon en su capacidad de solubilizar P en el medio NBRIP. La mayoría de las cepas que dieron positivo para este test, es decir aquellas con la capacidad de solubilizar P inorgánico, pertenecen al género *Penicillium* (Tabla 1.3).

Las comparaciones entre las frecuencias de los hongos rizosféricos en T1 en suelos Ns, (considerando la suma de los datos obtenidos para E+ y E-) mediante la prueba de χ^2 , se muestran en la Tabla 1.4, donde se ve que el género *Penicillium* es el único que presentó diferencias significativas, cuando fue aislado a partir del medio DRBC ($\chi^2=60.75$, $p < 0.05$). Los datos obtenidos para suelo estéril no fueron considerados en este análisis debido a los bajos recuentos registrados.

Tabla 1.3: Número de unidades formadoras de colonias de hongos rizosféricos asociados a *Jatropha curcas* en T0 y T1

Tratamiento	UFCT en MEA		UFCT en SFA		Fusarium		UFCT en TSM		Trichoderma		UFCT en DRBC		Penicillium/Aspergillus				Solubilizadores de P*	
			SFA	MEA	SFA	MEA	TSM	MEA	TSM	MEA	Pen. DRBC	Pen. MEA	Asp. DRBC	Asp. MEA	DRBC	MEA		
T0	Ns	124	78	0	2	6	4	0	0	0	127	3	3	0	0	3		
	s	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
T1	NsE+	158	90	1	6	152	3	1	131	64	38	4	0	0	5			
	sE+	255	186	0	0	102	1	0	98	16	87	13	10	2	4			
	NsE-	152	158	2	2	119	0	2	174	16	33	2	3	6	5			
	sE-	130	117	0	0	3	0	0	38	8	23	0	0	1	1			

Ns = suelo no estéril (T0), s= suelo estéril (T0). E+ = macetas descubiertas durante todo el experimento. E- = macetas cubiertas con una capa transparente de PVC (polyvinyl chloride), UFCT= unidades formadoras de colonia totales, MEA = extracto de malta y agar. SFA = medio selectivo de *Fusarium* (Selective *Fusarium* Agar). TSM = medio selectivo de *Trichoderma* (*Trichoderma* Selective Medium). DRBC = medio dclorán, rosa de bengala y cloranfenicol (Dichloran Rose Bengal and Chloramphenicol medium). * indica el número de cepas que fueron capaces de solubilizar fósforo

Tabla 1.4: Comparación entre las frecuencias de hongos rizosféricos mediante la prueba de χ^2 entre tratamientos (E+/E-) en T1 para suelo Ns. No se incorporaron los datos de suelo s debido a que se registraron muy pocos recuentos. *P*-valores significativos se muestran en negrita. SFA= Selective *Fusarium* Agar. MEA= extracto de malta y agar 2% con cloranfenicol. TSM= *Trichoderma* Selective Medium. DRBC= diclorán, rosa de bengala y cloranfenicol.

Hongos Rizosféricos	Tratamiento	χ^2	P
<i>Fusarium</i>	SFA	0.01	0.91
	MEA	1.90	0.17
<i>Trichoderma</i>	TSM	2.37	0.12
	MEA	0.38	0.54
<i>Penicillium</i>	DRBC	60.75	<0.0001
	MEA	0.24	0.62
<i>Aspergillus</i>	DRBC	1.40	0.23
	MEA	3.15	0.07
Solubilizadores de P	DRBC	0.60	0.44
	MEA	0.16	0.69

Análisis de la colonización micorrícica

La colonización de las raíces de *Jatropha curcas* por parte de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se observó en plantas de todos los tratamientos, con excepción de las plantas pertenecientes al tratamiento con suelo estéril, y sin colonización endofítica (sE-). En las plantas provenientes del tratamiento con suelo estéril, pero con colonización endofítica (sE+), se detectó una muy leve colonización micorrícica (Fig. 1.6).

Una alta colonización micorrícica se observó en plantas provenientes de los tratamientos E+, es decir colonizadas con endofitos la cual fue dos veces mayor que la observada en raíces de plantas de los tratamientos E-. Corroborando esta observación, se detectaron diferencias significativas en la colonización total de HMA (Micorrizas total en el gráfico) debido al tratamiento del suelo ($Lr_s=15.51$, $\chi^2_s < 0.05$), al estatus endofítico ($Lr_E=15.51$, $\chi^2_E < 0.05$) y a la interacción entre los factores ($Lr_{s*E}=32.93$, $\chi^2_{s*E} < 0.05$).

En el caso de arbusculos, se observaron diferencias significativas debido al tratamiento del suelo ($Lr_s=26.79$, $\chi^2_s < 0.05$), al estatus endofítico ($Lr_E=22.86$, $\chi^2_E < 0.05$) y a la interacción entre los factores ($Lr_{s*E}=23.15$, $\chi^2_{s*E} < 0.05$). Es importante señalar que la frecuencia de arbusculos en las plantas NsE+ cuadruplicó a la de las plantas E-. Se observó la misma relación para los coils ($Lr_s=20.80$, $\chi^2_s < 0.05$). Las diferencias observadas para vesículas se debieron principalmente al tratamiento del suelo ($Lr_s=20.80$, $\chi^2_s < 0.05$). Estos resultados se mostraron en la Figura 1.6. La Figura 1.7 muestra algunas de las estructuras analizadas mediante la tinción con Trypan Blue (Phillips & Hayman, 1970).

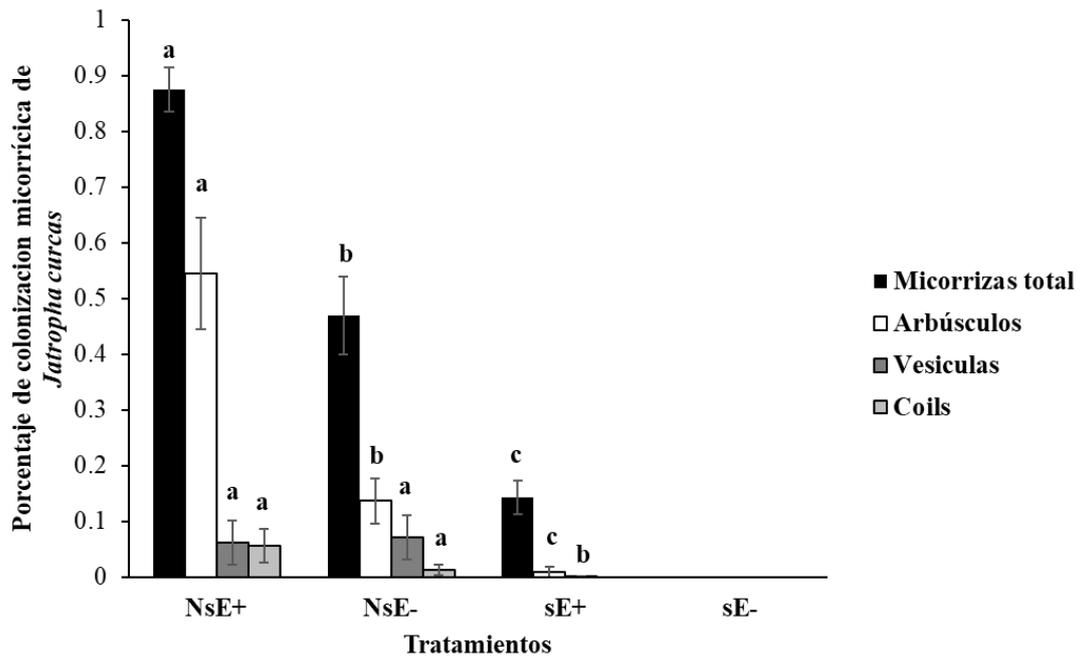


Figura 1.6: Porcentaje de colonización micorrícica de raíces de *Jatropha curcas*. en los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre estructuras ($P < 0.05$)

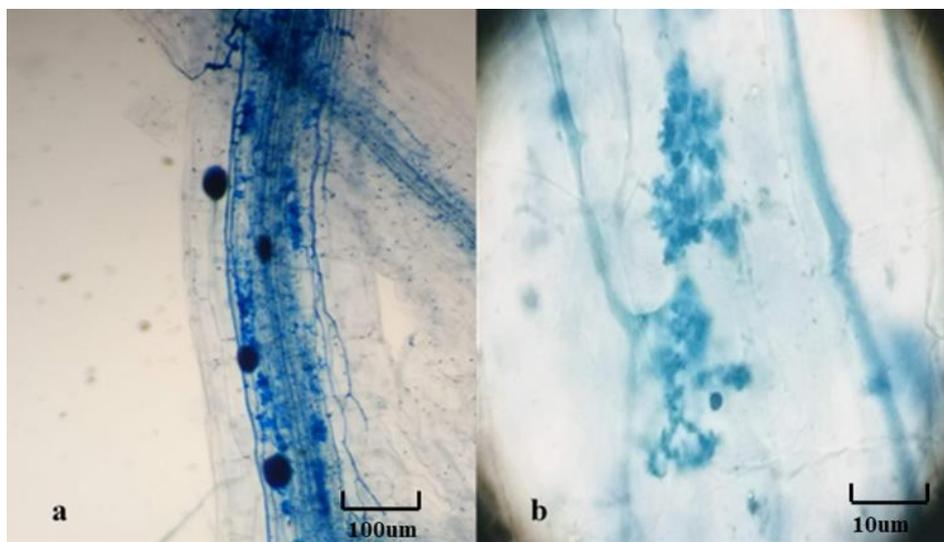


Figura 1.7: Raíces de *Jatropha curcas* provenientes de plantas cuyo tratamiento fue NsE+. Se observan (a) vesículas (100X) y (b) arbúsculos (1000 X) teñidos con Trypan Blue (Phillips & Hayman, 1970) estándar.

1.5 Discusión

Las plantas conviven con una comunidad compleja de microorganismos que habitan en su superficie o en su interior. Los HMA y los endofitos fúngicos forman parte de esa comunidad y, al igual que otros microorganismos, tienen un papel importante en los procesos de los ecosistemas y las interacciones de las plantas. Cualquier alteración en las comunidades del suelo provocadas por la invasión de especies exóticas pueden modificar la competencia y desencadenar un proceso alelopático (Anaya et al., 2013). En este contexto, los mecanismos involucrados en los procesos de modificación del suelo impulsados por las plantas deben estudiarse en profundidad para mejorar el conocimiento sobre la importancia de los componentes rizosféricos. Este es el primer estudio que evalúa el efecto de los endofitos foliares no sistémicos sobre comunidades rizosféricas y parámetros de suelo, a través de un método experimental, comparando dos estados endofíticos: E + vs. E-. Los resultados mostraron que los endofitos foliares asociados con *Jatropha curcas* L. juegan un papel clave como motor de cambios en las comunidades rizosféricas.

En este estudio, las plantas descubiertas (E +) cultivadas en suelo no estéril (NsE+) mostraron el valor más alto de infección endofítica, y en total, en los tratamientos E+ (independientemente de la condición del suelo) se registró el 97.33% de aislamientos totales. Kumar y Kaushik (2013), al caracterizar a los endofitos fúngicos foliares de *Jatropha curcas* informaron una frecuencia de aislamiento del 20.5%, un porcentaje mucho menor al registrado en este trabajo, probablemente debido a un esfuerzo de muestreo diferente. En este caso, el diseño experimental nos permitió controlar el estado endofítico y corroborar la transmisión horizontal de endofitos de *Jatropha curcas*. No se aislaron endofitos a partir del tratamiento sE- y una pequeña cantidad de cepas endofíticas

se aislaron del tratamiento NsE-, probablemente como consecuencia de la contaminación con propágulos de suelo durante el riego.

Con relación a la diversidad detectada, todos los endofitos identificados ya han sido informados como endofitos foliares (Vaz et al., 2014). Las cepas de hongos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Nigrospora* y *Phoma* han sido aisladas anteriormente de las hojas de *Jatropha curcas* por Jaiswal et al. (2013) y Kumar & Kaushik (2013). En el presente estudio, *Alternaria* fue el género más representativo con la mayor frecuencia de aislamiento para todas las plantas E + seguido de *Nigrospora*, que se aisló sólo a partir de plantas sE+. Los análisis moleculares y filogenéticos corroboraron las identificaciones de las cepas analizadas, y esto se visualiza en el árbol (Fig 1.3).

Los resultados del análisis de los parámetros del suelo en el momento inicial (T0) indicaron que hubo una disminución significativa del pH en el suelo estéril (S) en comparación con el suelo no estéril (Ns). Además, se observó un aumento significativo de Ct, Nt y Pt después de la tinalización. Estos resultados, junto con los obtenidos del análisis de hongos rizosféricos en T0, sugieren que el factor responsable de la disminución del desarrollo microbiano está relacionado con el proceso de tinalización del suelo. En el caso de Pt y Nt, al haber menos microorganismos en el suelo tinalizado, es de esperar que los niveles de estos parámetros aumenten debido a la ausencia de actividad microbiana.

Aunque los valores de pH disminuyeron y los de Ct aumentaron después de la tinalización del suelo, estos resultados fueron diferentes a los obtenidos por Malik et al. (2018), quienes observaron que los suelos con bajo pH presentan un menor desarrollo microbiano y, por lo tanto, tienen una acumulación deficiente de carbono orgánico. Sin

embargo, en el caso específico de la tindalización, la disminución del desarrollo microbiano se debió a la esterilización del suelo y no al bajo pH. Por lo tanto, el aumento de Ct después de la tindalización puede atribuirse a la falta de actividad microbiana y a la consiguiente acumulación de carbono orgánico.

Con respecto a los parámetros del suelo en T1, tanto suelo estéril como no estéril (sE+ y NsE+), mostraron una tendencia similar para la mayoría de los parámetros. En el caso del fósforo (Pt), los valores obtenidos fueron significativamente más bajos en los tratamientos de suelo Ns que en los de suelo s. Este resultado puede reflejar la mayor actividad biológica de los microorganismos (Kopáček et al., 2013). En el caso de la CE, el estatus endofítico parecería ser el factor que modula este parámetro, lo que sugiere que los endofitos podrían estar involucrados en la disminución de la salinidad del suelo. Existen muy pocos informes sobre las relaciones de las diferentes características del suelo y los endofitos foliares, por lo que sería muy valioso seguir trabajando en este aspecto.

Los análisis del número total de UFC en el suelo no estéril no mostraron diferencias entre las plantas E + y E-, lo que sugiere que los endofitos no promovieron cambios en la abundancia del microbiota del suelo; resultados similares se obtuvieron adicionalmente en la evaluación de especies fúngicas seleccionadas. Encontramos que la cantidad de UFC de *Penicillium* fue la más alta en el tratamiento E+; este resultado probablemente corresponde al enriquecimiento del suelo a partir de componentes comunes de ambientes aéreos, dado que este proceso estuvo impedido en los tratamientos E-. los resultados de este trabajo no apoyan la predicción de que los endofitos foliares promoverían el crecimiento de hongos biocontroladores y de solubilizadores de fósforo al tiempo que inhiben el crecimiento de hongos patógenos. Además, las diferencias entre T0 y T1 obtenidas en los análisis de hongos rizosféricos no respaldan la hipótesis propuesta por

Eppinga et al. (2006), donde se relaciona la acumulación de patógenos locales con la colonización de ecosistemas nativos por parte de plantas invasoras.). Sin embargo, estos resultados pueden deberse a las diferentes composiciones de las comunidades fúngicas del suelo.

Con respecto a los HMA, el resultado más sobresaliente fue la mayor colonización micorrícica observada en los tratamientos con plantas E+. Se sabe que varios factores como la altitud y la química del suelo, entre otros, pueden influir en la diversidad de HMA y la estructura de la comunidad (Marin et al., 2017), pero existe una brecha en el conocimiento sobre la interacción de HMA con otros microorganismos. Las plantas a menudo interactúan con múltiples microorganismos simultáneamente y estas interacciones pueden influir en la dinámica de las poblaciones de hospedantes y simbiontes. Hasta ahora, la mayoría de los estudios con la intención de evaluar la interacción directa o indirecta entre los endofitos foliares y los hongos micorrícicos se han realizado en especies de gramíneas endófitas fúngicas foliares sistémicas (Novas et al., 2005; Vignale et al., 2018; Liu et al., 2020; Zhong et al., 2021) y, según se sabe, no hay información disponible sobre otras plantas herbáceas y leñosas. Dieng et al. (2015) estudiaron el efecto de *Jatropha curcas* sobre los HMA en el oeste de Senegal, encontrando un pronunciado cambio de composición en las comunidades de HMA en suelos cultivados por *Jatropha curcas* en comparación con suelos no cultivados con dicha planta. Aquí, a través de un experimento de mesocosmos, se analizó por primera vez el efecto de los endofitos foliares no sistémicos sobre HMA en *Jatropha curcas*, detectando promoción de la micorrización en plantas E+. Este resultado concuerda con estudios previos sobre el endófito fúngico foliar sistémico de gramíneas silvestres (Novas et al., 2005; Vignale et al., 2018)

Considerando la mayor absorción de nutrientes a través de la simbiosis micorrícica, un efecto positivo en la colonización de HMA puede afectar el crecimiento y la capacidad competitiva de las plantas hospedantes, haciendo que este resultado sea muy promisorio. Además, se detectó un incremento significativo en la frecuencia arbuscular cuando la planta se asoció con endofitos, resultado notable teniendo en cuenta el papel predominante de los arbusculos en la fisiología micorrícica.

Dado que el género *Alternaria* tuvo la mayor frecuencia de aislamiento, proponemos que cepas de este género podrían tener un rol clave en la promoción de la micorrización en *Jatropha curcas*. Teniendo en cuenta estos resultados, se llevaron adelante las investigaciones descritas en el capítulo 3 de estas tesis con el fin de dilucidar si existe una relación entre la presencia de cepas del género *Alternaria* en diferentes hospedantes y la micorrización.

Debido al escaso conocimiento sobre los mecanismos por los cuales los endofitos promueven el crecimiento de las plantas, se compararon los parámetros de crecimiento entre las plantas E+ y E- bajo diferentes tratamientos del suelo. El análisis de la biomasa vegetal mostró que hubo diferencias significativas en el peso seco de vástagos y en el peso seco de las raíces debido al tratamiento del suelo. En todos los casos, los valores más altos se registraron en tratamientos con suelo estéril, en concordancia con trabajos previos (Del Fabbro & Prati, 2015; entre otros). Brainard et al. (2013) encontraron que la cebada (*Hordeum vulgare*) y la canola (*Brassica napus*) tuvieron una respuesta de crecimiento negativa cuando se cultivaron en suelo no estéril, o cuando se inoculó con HMA, mientras que la biomasa de la soja (*Glycine max*) aumentó cuando las plantas se cultivaron en suelo estéril, y no se vio afectada por la inoculación con HMA. Los resultados obtenidos mostraron que *Jatropha curcas* tuvo una respuesta de crecimiento negativa a la infección

endofítica, lo que sugiere que, al menos en el diseño de este experimento, los endofitos no promueven el crecimiento del hospedante y si existe un efecto positivo, podría ser a través de un mecanismo alternativo. Estos resultados se han detectado en estudios anteriores y pueden deberse al costo generado por demanda de nutrientes por los simbiontes simultáneos (Novas et al., 2005).

En general, estos hallazgos aumentan la comprensión sobre cómo la asociación *Jatropha curcas*-endofitos interactúa con el medio ambiente.

CAPÍTULO 2

Procesos de retroalimentación en *Jatropha curcas*

Abreviaturas del capítulo 2:

RPS: retroalimentación planta-suelo

E+: Plantas expuestas al inóculo ambiental

E-: Plantas que no fueron expuestas al inóculo ambiental

LV: largo de vástago

LR: largo de raíz

PFV: peso fresco de vástago

PFR: peso fresco de raíz

PSV: peso seco de vástago

PSR: peso seco de raíz

J+: macetas acondicionadas con *Jatropha curcas*

J-: macetas no acondicionadas con *Jatropha curcas*

Jc: macetas donde se sembró *Jatropha curcas* luego del acondicionamiento

Jm: macetas donde se sembró *Jacaranda mimosifolia* luego del acondicionamiento

J+E+: acondicionamiento de macetas con *Jatropha curcas* y expuestas al ambiente

J+E-: acondicionamiento de macetas con *Jatropha curcas* y no expuestas al ambiente

J-E+: acondicionamiento de macetas sin *Jatropha curcas* y expuestas al ambiente

J-E-: acondicionamiento de macetas sin *Jatropha curcas* y no expuestas al ambiente

HMA. hongos micorrícicos arbusculares

2.1 Introducción:

El término retroalimentación planta – suelo (RPS) se ha acuñado para describir las interacciones entre las plantas y los organismos del suelo (Bever 1994; Bever et al., 1997), donde las plantas, como consecuencia de las interacciones, alteran las propiedades del suelo, modificando la disponibilidad de nutrientes y la biota del suelo. La RPS influye en el rendimiento de las plántulas de las siguientes generaciones, con los consiguientes efectos en las poblaciones y comunidades de plantas (Bennett et al., 2017; Fujii et al., 2018; Bennett & Klironomos, 2019) y se está convirtiendo en un concepto importante para explicar las dinámicas de la vegetación, el carácter invasor de plantas exóticas en nuevos hábitats y, cómo los ecosistemas terrestres responden al uso global de la tierra y al cambio climático (van der Putten et al., 2016). Una serie de revisiones se han centrado en cómo interpretar los efectos negativos y positivos de esta retroalimentación y su papel en la organización comunitaria y el funcionamiento del ecosistema (Bever et al., 1997; Bever 2003; Reynolds et al., 2003; Van der Putten 2003; Ehrenfeld et al., 2005; Reinhart & Callaway 2006; Crawford et al., 2019; Lal, 2020).

Según varios estudios, se ha llegado a un consenso general acerca de que las interacciones de retroalimentación planta-suelo (RPS) son los principales impulsores de la diversidad de la vegetación y el funcionamiento de los ecosistemas. Estas interacciones pueden influir significativamente en la composición y estructura de la comunidad de plantas, así como en la calidad y cantidad de nutrientes en el suelo (Wardle et al., 2002; Bever, 2003; Reynolds et al., 2003; Van der Putten, 2003; Crawford et al., 2019; van Ruijven, et al., 2020).

Las tres categorías principales de la biota del suelo que intervienen en los procesos de RPS son: enemigos (patógenos microbianos del suelo, nematodos herbívoros, larvas de insectos y otros invertebrados), simbioses (hongos micorrícicos, hongos endofíticos no micorrícicos, bacterias endofíticas, organismos fijadores de nitrógeno y microorganismos promotores del crecimiento de las plantas presentes en la rizosfera) y descomponedores (organismos involucrados en ciclos de carbono y nutrientes, que descomponen desechos, exudados de raíces y materia orgánica del suelo) (van der Putten et al., 2016). Cada uno puede influir en el crecimiento de la planta directa y/o indirectamente a través de su influencia en las propiedades físico-químicas del suelo, como pH, contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua, temperatura y estructura del suelo.

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y los endófitos fúngicos establecen simbiosis ampliamente distribuidas con la mayoría de las especies de plantas en sus hábitats naturales, y estas asociaciones suelen ser de naturaleza mutualista. Los principales beneficios conferidos a las especies de plantas difieren entre los HMA y los endófitos foliares, donde los primeros brindan una mejor adquisición de nutrientes y los segundos brindan resistencia al estrés ambiental y la presión de enemigos naturales (Hartley & Gange, 2009). Tanto los HMA como los hongos endofíticos en general (endófitos de raíz y endófitos foliares), son microorganismos que se asocian con las plantas y pueden influir en los procesos de RPS. Se ha observado que ambos tipos de hongos requieren fotosintatos (productos de la fotosíntesis) de la planta hospedante, lo que puede generar una competencia indirecta entre ellos que se expresa a través de la planta hospedante (Williams et al., 2010). Esta competencia puede afectar la cantidad y calidad de los recursos que la planta hospedante aporta al suelo, lo que a su vez puede afectar la composición de la comunidad microbiana del suelo y la disponibilidad de nutrientes para otras plantas en la comunidad. Diversos estudios acerca de la expansión

de plantas invasoras en diferentes ecosistemas han reportado que los HMA y los endófitos de raíz pueden tener un rol en las RPS, tanto en la facilitación como en la limitación de la expansión de especies no nativas (Abarca, 2021). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el rol que los endófitos foliares cumplen en estos procesos, y la mayoría son de endofitos foliares de transmisión vertical (Zhong et al., 2022).

En un contexto donde la crisis energética tiene relevancia a nivel mundial y las economías globales se ven vulneradas, la búsqueda de energías alternativas y sustentables resulta urgente y necesaria. El cambio climático y las invasiones biológicas están reorganizando rápidamente la distribución de especies, reestructurando las comunidades biológicas de muchos ecosistemas en todo el mundo (Azurro et al., 2019). Los árboles exóticos plantados con fines de producción tienen fuertes impactos económicos positivos directos en las economías locales y nacionales de muchos países, lo que a menudo conduce a conflictos de intereses cuando la especie se vuelve invasora, con fuertes impactos negativos en el ecosistema. Especies de árboles exóticos de crecimiento rápido introducidas como plantaciones forestales han tenido efectos ecológicos perjudiciales sobre la hidrología del suelo o la diversidad de la vida silvestre (Dodet & Collet, 2012). Estos fenómenos pueden dar lugar a invasiones biológicas es decir a la propagación de especies exóticas que consiguen extenderse fuera de los límites de su área de distribución y formar poblaciones que desplazan a las comunidades nativas y alteran el funcionamiento de los ecosistemas afectados (Elton & Elton, 1958). Estudiar las relaciones de RPS que estas especies exóticas invasoras establecen con los ecosistemas nativos, resulta de especial interés.

Las plantaciones de *Jatropha curcas* para la producción de biodiésel en regiones tropicales y subtropicales están actualmente en auge. Aunque las especies de *Jatropha*

curcas son bien conocidas por sintetizar una gama de sustancias tóxicas, los efectos del monocultivo de *Jatropha curcas* sobre ecosistemas nativos apenas se ha investigado (Dieng et al., 2015). En este trabajo, proponemos ampliar el conocimiento de las interacciones que *Jatropha curcas* establece con el suelo y con los hongos endofíticos foliares, así como los efectos de estas interacciones tanto en plantas de la misma especie como en una planta nativa (*Jacaranda mimosifolia*). También examinaremos el impacto de estas interacciones en las comunidades microbianas asociadas, como los hongos rizosféricos y los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Estas actividades fueron desarrolladas con el fin de encontrar herramientas que nos permitan establecer si *Jatropha curcas* representa un peligro como planta exótica invasora en ecosistemas nativos

2.2 Objetivo e hipótesis

Las hipótesis de este trabajo son:

1. *Jatropha curcas establece procesos de retroalimentación positiva con el suelo.*
2. *Los procesos de retroalimentación establecidos por Jatropha curcas están influenciados por las comunidades endofíticas foliares.*

Los objetivos de esta sección son:

1. *Identificar el tipo de proceso de retroalimentación que Jatropha curcas establece con el suelo.*

2. *Determinar si los endofitos foliares de *Jatropha curcas* modulan: la colonización de raíces por parte de HMA; la abundancia de hongos biocontroladores, solubilizadores de fósforo, y hongos fitopatógenos seleccionados de la comunidad rizosférica.*

3. *Establecer si la comunidad endofítica foliar de *Jatropha curcas* se correlaciona con el proceso de retroalimentación.*

2.3 Materiales y métodos:

Área de estudio

Los experimentos realizados en el presente estudio se llevaron a cabo en un campo experimental de la localidad de Boulogne, en la provincia de Buenos Aires (34° 32' 31" S, 58° 26' 24" W, altitud 9 m, Buenos Aires-Argentina) entre los meses de enero de 2016 y abril de 2017. La región se caracteriza por presentar precipitaciones anuales promedio de 1040 mm, siendo Julio el mes más seco con precipitaciones de 59 mm y marzo el mes más húmedo es, con precipitaciones de 115 mm. La temperatura anual promedio es de 18.32°C (datos obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional de Argentina).

Material vegetal

Para la fase de acondicionamiento de suelo, se utilizaron semillas de *Jatropha curcas* al igual que en el capítulo 1 (ver capítulo 1, sección 2.2). Para los ensayos de retroalimentación o fase respuesta se utilizaron semillas de *Jacaranda mimosifolia*, recolectadas en la ciudad de Buenos Aires y alrededores, y las semillas de *Jatropha curcas* fueron donadas por el Ing. Diego Wassner. Las semillas de ambas especies fueron

sembradas en macetas con suelo acondicionado (ver más adelante) o no con *Jatropha curcas*.

Jacaranda mimosifolia

El género *Jacaranda* es neotropical y tiene alrededor de 50 especies (Morawetz, 1982; Gentry, 1992). La especie *Jacaranda mimosifolia* D. Don, 1822, comúnmente llamada jacarandá o tarco, es un árbol subtropical, de la familia *Bignoniaceae*, originario de Bolivia, Paraguay y Argentina, país donde se la encuentra en Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Misiones, Entre Ríos y Buenos Aires. *Jacaranda mimosifolia* es ampliamente cultivada por sus vistosas flores violeta, razón por la cual es muy utilizada para el arbolado urbano (Ayarde, 1993; Cabrera, 1993; Rivera, 1994; Zuloaga & Morrone, 1999; Perovic et al., 2000; Aragón & Morales, 2003; Alves et al., 2010).

Esta especie se caracteriza por su porte arbóreo, de 10-15 m de altura, con el tronco de 40-70 cm de diámetro, ramas escasamente pubescentes, generalmente lenticeladas, las más jóvenes a menudo algo comprimidas. Sus hojas son decusadas, paribipinnadas, de 30-60 cm de largo, de los cuales 4-8 cm corresponden al pecíolo, raquis principal subglabro, con 10-20 pares de pinnas subopuestas, de 7-14 cm de largo, de los cuales 6-9 mm corresponden al pecíolo con 15-30 pares de folíolos, sésiles, generalmente subopuestos, aovado oblongos, de 7-13 mm de largo x 3-4 mm de ancho, pubescentes o subglabros, bordes enteros, nervadura principal algo prominente en la cara inferior, impresa en la superior, las secundarias inconspicuas, ápice mucronado, folíolo terminal notablemente acuminado y más grande que los otros, de 15-25 mm de largo, raquis secundario algo pubescente y surcado en la parte superior. Inflorescencias dispuestas en panojas terminales erguidas, multifloras, de 20-30 cm de largo. Flores azul-violáceas,

hermafroditas, de 4 cm de largo, sobre pedicelos de 3-7 mm de largo. Cáliz pequeño, pubescente, tubo de ca. 2mm de largo, con 5 dientes de ca. 1 mm de largo. Corola infundibuliforme, tubo de ca. 3 cm de largo, angosto y notablemente pubescente en su tercio inferior, el resto ensanchado y menos pubescente o subglabro, limbo 5-lobulado, lóbulos interiormente pubescentes, subiguales (2 más pequeños y 3 más grandes), de 6-10 mm de largo x 8-10 mm de ancho. Su fruto es una cápsula leñosa, dehiscente, suborbicular, castaña, comprimida lateralmente, de 5-7 cm de diámetro; semillas castañas, numerosas elípticas, comprimidas lateralmente, de 7-9 mm de largo x 6-7 mm de ancho, rodeadas por un ala membranácea, transparente y midiendo en total 15-20 mm de diámetro (Digilio & Legname, 1966).

Diseño experimental

Se utilizaron 100 dm³ de suelo comercial (TerraFertil S.A.) distribuido en 80 macetas de 5 lts cada una. En la figura 2.1 se diagraman las fases de acondicionamiento de las macetas que se utilizaron para evaluar los efectos de retroalimentación.

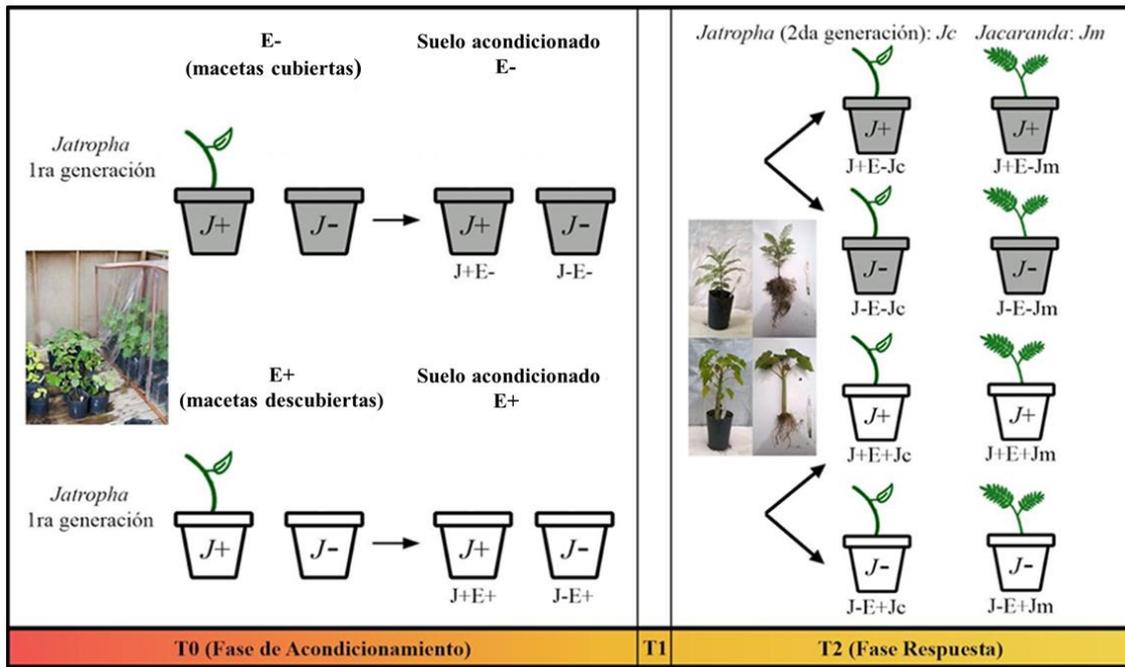


Figura 2.1: Diseño experimental que se realizó para el estudio de los procesos de retroalimentación. Las macetas grises representan el estatus endofítico E-, y las macetas blancas representan el estatus endofítico E+. Las macetas sin plantas representan macetas luego del acondicionamiento del suelo, previo a la siembra de las plantas de segunda generación.

Fase de acondicionamiento de las macetas

Al igual que en capítulo 1, para incorporar el estatus endofítico como factor en la fase de acondicionamiento, 40 macetas (5 L) se mantuvieron sin ninguna barrera que las aislara del ambiente, con el fin de establecer, posteriormente, plantas E+ (con endofitos), inoculadas naturalmente con propágulos presentes en el ambiente. Adicionalmente, 40 macetas se mantuvieron durante todo el proceso de acondicionamiento bajo la protección de una barrera contra los propágulos presentes en el ambiente, donde luego se desarrollarán plantas E- (sin endofitos o con baja frecuencia de estos). Al igual que en el Capítulo 1 se utilizó plástico cristal, separado unos centímetros del suelo para evitar el aumento de la temperatura.

De las 40 macetas E+, 20 se utilizaron para cultivar plantas de *Jatropha curcas* (a partir de semillas pre-germinadas). Para ello se sembraron 3 semillas de *Jatropha curcas* L. en cada maceta J+. Una vez que germinaron, y las plantas alcanzaron los 5 cm de altura se eligió la planta que estuviera en mejores condiciones, descartándose las otras dos, asegurando de esta manera la presencia de una planta por maceta (Fig. 2.1). En las 20 macetas E+ restantes no se sembraron plantas. Del mismo modo se procedió con las 40 macetas provenientes del estatus endofítico E-.

De esta manera el diseño experimental de esta etapa del trabajo consistió en un diseño factorial de 2X2 completamente aleatorizado. A partir del mismo se obtuvieron 4 tratamientos con 20 macetas cada uno. Los factores principales fueron

- i- Acondicionamiento de suelo: el suelo acondicionado con *Jatropha curcas* se denominó J+, y el suelo no acondicionado se denominó J-

- ii- Estatus endofítico: las plantas de *Jatropha curcas* infectadas con endofitos se nombraron E+, y las plantas libres de endofitos, E-.

De la combinación de dichos factores resultaron las siguientes categorías de macetas, o tratamientos de acondicionamiento: J+E+, J+ E-, J-E+ y J-E-

Fase respuesta

Para el estudio del crecimiento de la segunda generación de plantas o fase respuesta, se procedió como se explica a continuación.

Luego del período de acondicionamiento (5 meses), las plantas de *Jatropha curcas* provenientes de los tratamientos J+ E+ y J+E- se retiraron, y posteriormente plantas de *Jatropha curcas* o *Jacaranda mimosifolia* (según el tratamiento) se sembraron en todas las macetas, aun en aquellas correspondientes a los tratamientos sin acondicionamientos con plantas de *Jatropha curcas*: J- E+ y J- E-.

En esta etapa el diseño experimental consistió en un diseño factorial de 2X2X2 completamente aleatorizado. A partir del mismo se obtuvieron 8 tratamientos con 10 macetas cada uno. Los factores principales fueron los mismos que en la fase acondicionamiento, pero con la incorporación de la planta de segunda generación

- i- Acondicionamiento de suelo según presencia de *Jatropha curcas*: el suelo acondicionado con *Jatropha curcas* se denominó **J+**, y el suelo no acondicionado se denominó **J-**
- ii- Estatus endofítico: las plantas de *Jatropha curcas* infectadas con endofitos se nombraron **E+**, y las plantas libres de endofitos, **E-**.

Las macetas acondicionadas donde se sembró *Jatropha curcas* se denominaron **Jc** y las macetas acondicionadas donde se sembró *Jacaranda* se denominó **Jm**. Por lo tanto, combinando todos los factores se establecieron las siguientes categorías:

J+E+Jc, J-E+Jc, J+E- Jc, J-E-Jc (para macetas con *Jatropha curcas* como planta de segunda generación) y **J+E+Jm, J-E+Jm, J+E-Jm, J-E-Jm** (para macetas con *J. mimosifolia* como planta de segunda generación).

Corroboración del estatus endofítico de las plantas de primera generación

Se realizó un análisis de la comunidad endofítica sobre hojas de plantas de *Jatropha curcas* (primera generación) al final de la etapa de acondicionamiento, con el fin de corroborar el estatus endofítico. Para ello se seleccionaron al azar 5 plantas de cada tratamiento. De cada una de estas plantas, se extrajeron al azar 3 hojas, de las cuales se tomaron 6 fragmentos circulares utilizando un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro. Esto generó un total de 90 fragmentos de hojas por tratamiento. Cada fragmento se lavó y se esterilizó superficialmente por inmersión siguiendo la siguiente secuencia: 1 min. en etanol al 70%, 2 min. en solución de lavandina 65 g/lit al 4%, y 30 seg. en etanol al 50%). Cada fragmento se transfirió luego a placas de Petri de 90 mm con medio MEAch. Las placas se incubaron a 24°C y se examinaron periódicamente luego de las primeras 24hs de incubación. En el momento en que los fragmentos presentaron crecimiento fúngico, el micelio se aisló y se transfirió a placas de Petri de 60 mm con MEAch. Luego se realizaron los repiques y controles necesarios para obtener cultivos puros. Los mismos se almacenaron a 4 °C en cámara de cultivo.

Para la identificación morfológica de los hongos endofíticos aislados a partir de plantas E+ y E-, y para el cálculo de sus frecuencias se procedió de la misma manera que en el capítulo 1 (Ver capítulo 1, “Caracterización de la comunidad endofítica”)

Análisis de parámetros químicos del suelo

Los parámetros químicos del suelo se analizaron a partir de tres muestras por tratamiento. Cada muestra estaba compuesta por una mezcla (pool) de 3 porciones de suelo tomadas

al azar provenientes de tres macetas diferentes. Los análisis se realizaron de la siguiente manera:

T0, fase de acondicionamiento: se tomaron muestras de suelo previo al sembrado de las plantas utilizadas para acondicionar las macetas. Se evaluaron los siguientes parámetros: pH, C.E., C, P, N y C/N.

T1: se tomaron muestras de las macetas luego la fase de acondicionamiento. Se evaluaron los mismos parámetros que en T0.

T2, fase respuesta: se tomaron muestras luego del periodo de evaluación de retroalimentación, es decir al momento de la cosecha de las plantas de *Jatropha curcas* y de *Jacaranda mimosifolia*. Se evaluaron los siguientes parámetros: pH, C.E., C, P y Cenizas.

Los análisis de suelo se realizaron en los laboratorios de la cátedra de edafología de la Facultad de Agronomía (UBA) en Buenos Aires, Argentina.

Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento vegetal.

Al finalizar la fase respuesta, se descalzaron 5 plantas de *Jatropha curcas* y 5 de *Jacaranda mimosifolia*, provenientes de cada tratamiento. Las plantas se cortaron al nivel del cuello, y se separaron las raíces y los vástagos. Una pequeña muestra de las raíces se separó de cada planta, y se reservó para el análisis de HMA (como se explicará más adelante). El resto de las raíces y los vástagos se procesaron y se registraron los valores de largo de vástago (LV) y largo de raíz (LR). También se registraron pesos frescos de

vástago (PFV) y raíz (PFR), de manera separada, para tener un registro del contenido de humedad de las muestras. Luego las muestras se sacaron en estufa a 60°C. Se registró el peso de las muestras de vástago (PSV) y raíz (PSR) a lo largo de 15 días, período en el cual se alcanzó el peso seco constante para todas las muestras (como se explicó en el capítulo 1, las hojas y tallos de *Jatropha curcas* son muy carnosas, por lo que el tiempo de secado es superior al esperado). Para no introducir variabilidad en el tratamiento, las plantas de *Jacaranda* fueron sometidas al mismo tiempo de secado.

Por otro lado, un grupo de plantas tanto de *Jatropha curcas* como de *Jacaranda mimosifolia* se separaron (3 plantas de cada tratamiento) luego del secado de raíces y vástagos con el fin de analizar el contenido de fósforo en las mismas. Dichas mediciones fueron realizadas por la cátedra de edafología de la Facultad de Agronomía (UBA).

Análisis de hongos rizosféricos

Análisis de hongos solubilizadores de P, patógenos y biocontroladores

Luego de la fase respuesta (T2) se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) provenientes de diluciones de suelo a partir de muestras de cada tratamiento, al igual que en el capítulo 1, pero con algunas modificaciones:

El método utilizado fue el de dilución en placa, basándonos en una curva de calibración donde se determinó que la dilución óptima resultó ser 5:10000 (g suelo: ml de H₂O). Una vez realizada la curva de calibración y seleccionada la dilución óptima, 5 macetas de cada tratamiento se seleccionaron al azar para la evaluación cuantitativa de solubilizadores de P, patógenos y biocontroladores. De cada dilución de suelo rizosférico proveniente de cada maceta seleccionada, se distribuyeron 0.1 ml de manera uniforme sobre placas de

Petri de 90 mm que contenían MEAch y DRBC. Esto se realizó utilizando un rastrillo bacteriológico de vidrio o una espátula de Digralsky. Se utilizaron 5 réplicas por muestra de suelo y medio de cultivo. Las cepas recuperadas en DRBC, se testearon luego para evaluar su capacidad de solubilizar fósforo. Para este análisis las cepas se cultivaron en placas de Petri conteniendo NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) como medio indicador de capacidad de solubilización. La formación de una zona de halo claro alrededor de la colonia después de 5 días de incubación indicó la capacidad solubilizadora de P (Wakelin et al., 2004).

Análisis de la colonización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

Para realizar este análisis, muestras de raíces de *Jatropha curcas* y *Jacaranda mimosifolia* se tomaron a partir de las plantas utilizadas para el análisis de biomasa, luego de la cosecha y previo al secado de estas. Se tuvo cuidado de sacar muestras homogéneas de todas las plantas para no afectar el análisis de biomasa. El nivel de colonización de las raíces de *Jatropha curcas* y de *J. mimosifolia* por parte de hongos micorrícicos arbusculares se estimó como se explicó en el capítulo 1 (ver capítulo 1, “Análisis de la colonización de raíces por hongos micorrícicos arbusculares (HMA)”).

Análisis Estadístico

Las diferencias en los parámetros químicos del suelo al comienzo (T0) y al final (T1) de la fase de acondicionamiento se analizaron por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La significancia estadística de las diferencias observadas entre los tratamientos en el T1 se evaluó mediante ANOVA de dos factores. Los datos del T1 se estandarizaron con las medias observadas en T0, siguiendo la siguiente fórmula: $(x_i/x_{T0}-1)$, donde x_i es

el valor de las variables medidas a T1 y x_{T0} son las medias registradas en T0. Los valores negativos reflejaron un decrecimiento en los parámetros entre T0 y T1. Todas las comparaciones de a pares se realizaron utilizando la prueba de Tukey HSD.

Los resultados de la biomasa de las plantas en T2 se analizaron utilizando ANOVA de dos factores ($p < 0.05$) donde los factores principales fueron: acondicionamiento con *Jatropha curcas* y estatus endofítico.

La frecuencia porcentual de los aislamientos de endofitos fúngicos foliares (%) para cada tratamiento se calculó de la siguiente manera: $(\text{Número de fragmentos con aislamientos endofíticos pertenecientes a un género} / \text{Total de fragmentos analizados}) \times 100$. Para analizar la significancia estadística entre los aislamientos obtenidos entre plantas asignadas a los tratamientos E+ y E-, se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) siguiendo la distribución de Poisson.

Las diferencias observadas en el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) y en el total de colonización micorrícica obtenidas en la fase respuesta a partir de las muestras de suelos rizosféricos y raíces asociadas a *Jatropha curcas* o *Jacaranda mimosifolia* se analizaron utilizando modelos lineales generalizados (GLM) con una distribución de Poisson. En los casos donde se detectó sobredispersión de los datos, estos se modelaron a través de una distribución binomial negativa. Se realizó además una prueba de likelihood (Likelihood ratio test, LRT) o un análisis de la devianza (Analysis of Deviance) de los modelos binomiales para evaluar las diferencias significativas debidas al factor tratamiento y una prueba de comparaciones múltiples de a pares (Tukey). Para la elección del modelo se siguió el criterio de Akaike (AIC).

En todos los análisis, los supuestos se testearon. Todos los análisis fueron realizados con la plataforma para análisis estadísticos R.

2.4 Resultados

Caracterización de la comunidad endofítica asociada a *Jatropha curcas* en la fase de acondicionamiento

Para corroborar el estatus endofítico y realizar una comparación entre las comunidades endofíticas aisladas a partir de hojas de *Jatropha curcas* de plantas E+ y E- luego de la fase de acondicionamiento (T1), se analizaron un total de 360 fragmentos de hojas (90 fragmentos correspondientes a cada tratamiento). A partir de hojas correspondientes a plantas en la fase de acondicionamiento, se obtuvieron 160 aislamientos de endofitos, correspondiendo a 10 géneros diferentes. El porcentaje de recuperación de cepas más alto se obtuvo a partir del tratamiento E+ (120 cepas, 75%), mientras que a partir del tratamiento E- se obtuvieron 40 cepas (25%) (Fig. 2.2).

El análisis de estos valores mostró que las diferencias observadas fueron significativas ($Z=-6.12$, $p<0.05$). Esto está en concordancia con el objetivo de la metodología utilizada para conseguir plantas que representen ambos estados de asociación endofítica, E+ vs E-

Al igual que en los ensayos descritos en el Capítulo 1, *Alternaria* fue el género más abundante (frecuencia), presente en los tratamientos E+ y E-, seguido por *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Dendryophiopsis*, *Trichoderma*, *Arthrinium*, *Phyllosticta* y un género de levaduras que no pudo ser identificado. En la

tabla 2.1 se muestran las frecuencias de aislamientos asignados a los géneros obtenidos a partir de hojas de *Jatropha curcas* E+ y E-.

Tabla 2.1: Frecuencias de aislamientos (calculada según la fórmula: FA (Frecuencia de aislamientos por género) = (Número de fragmentos con aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados) * 100) de los diferentes géneros de endofitos a partir de hojas de *Jatropha curcas* luego de la fase de acondicionamiento (T1) E+ (con inóculo ambiental) y E- (sin inóculo ambiental). *Alternaria* es el género más abundante en plantas E+ y E-. Levadura= un aislamiento correspondiente a un género de levaduras sin identificar.

Género	Tratamiento	
	E+	E-
<i>Alternaria</i>	86,67	75,00
<i>Arthrinium xenocordella</i>	0,00	5,00
<i>Cladosporium</i>	0,83	5,00
<i>Colletotrichum</i>	3,33	5,00
<i>Dendryophiopsis</i>	1,67	0,00
<i>Fusarium</i>	1,67	0,00
<i>Levadura</i>	0,00	2,50
<i>Nigrospora</i>	1,67	2,50
<i>Penicillium</i>	2,50	2,50
<i>Phyllosticta</i>	0,00	2,50
<i>Trichoderma</i>	1,67	0,00

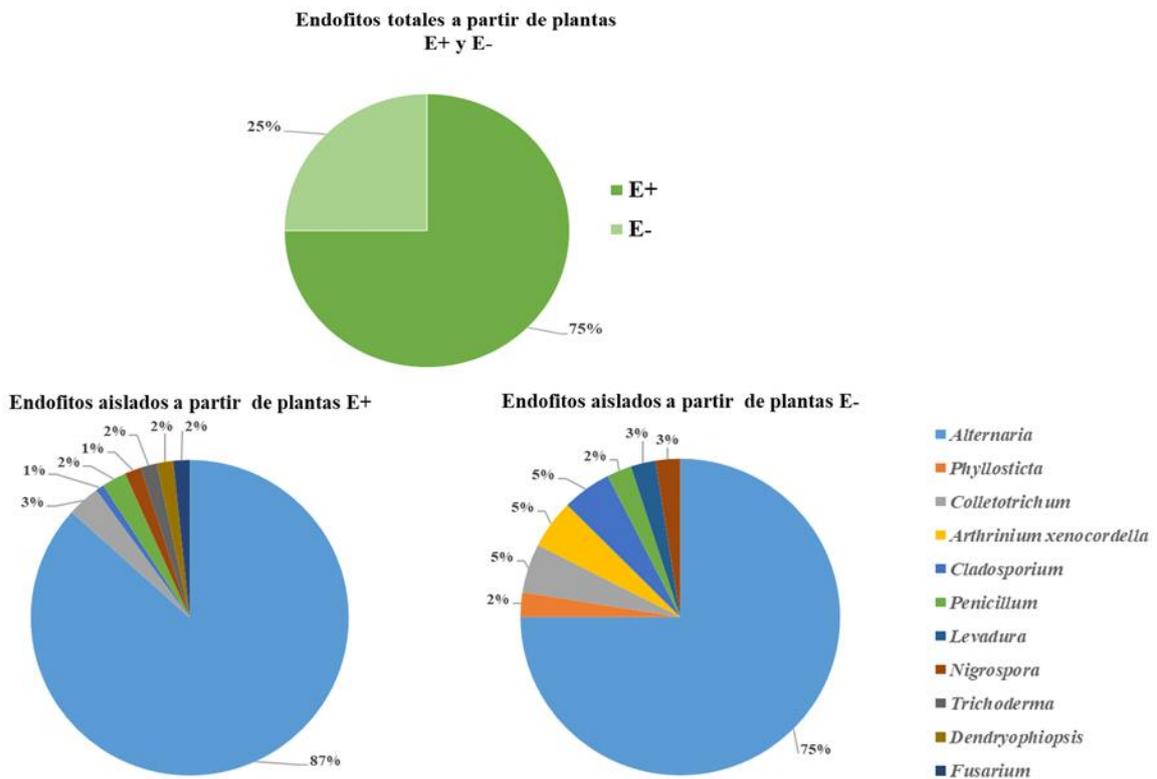


Figura 2.2: Porcentaje de endofitos aislados a partir de hojas de *Jatropha curcas* de plantas que se mantuvieron expuestas, E+ y de plantas que se mantuvieron cubiertas (E-) durante la fase de acondicionamiento. En ambos casos el género *Alternaria* resultó ser el más abundante.

Análisis de los parámetros químicos del suelo

Análisis de los parámetros de suelo estandarizados (T1-T0)

Con el fin de caracterizar parámetros seleccionados del suelo para ser utilizado en los ensayos de retroalimentación se realizó un análisis de los datos obtenidos para los diferentes parámetros de suelo de la siguiente manera: a los valores obtenidos en T1, se le restaron los valores obtenidos en T0, que figuran en la tabla 2.2. Este análisis fue útil para dilucidar si el acondicionamiento de las macetas (acondicionamiento con *Jatropha curcas*: J+/J-, estatus endofítico o tratamiento de las macetas: E+/E-) modificó de alguna manera dichos parámetros.

La figura 2.3 muestra que los valores de pH, y C/N se incrementaron luego del acondicionamiento de las macetas, mientras que los valores de CE, C, P y N disminuyeron en el proceso.

Tabla 2.2: Valores promedio y sus desvíos estándar obtenidos a partir de muestras de suelo en T0 (al principio de la fase de acondicionamiento) para los diferentes parámetros del suelo: pH (a partir de una suspensión 1:2,5 de suelo-agua), CE (conductividad eléctrica; dS/m (decisiemens por metro)), C (carbono: %), P (fósforo: %) y C/N (relación carbono/nitrógeno).

Parámetros de suelo en T0					
pH	CE	C	P	N	C/N
4.4±0.0	1.91±0.46	29.36±0.83	19.26±0.24	2.84±0.09	10.34±0.46

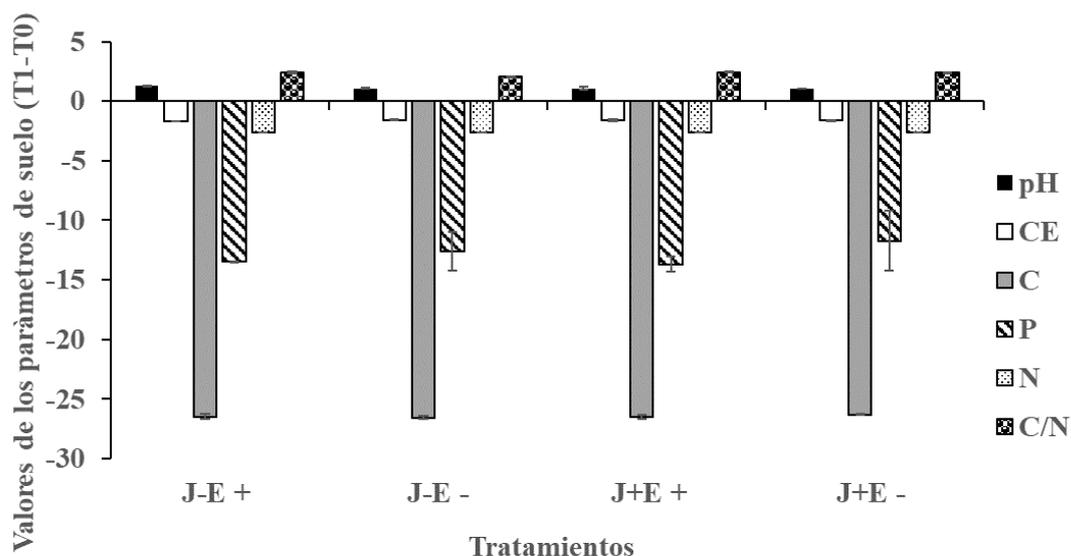


Figura 2.3: Valores promedio obtenidos a partir de la resta de los valores obtenidos en T1 y T0 (al final y al principio de la fase de acondicionamiento) para los diferentes parámetros del suelo: pH (a partir de una suspensión 1:2,5 de suelo-agua), CE (conductividad eléctrica; dS/m (decisiemens por metro)), C (carbono: %), P (fósforo: %) y C/N (relación carbono/nitrógeno).

Análisis de los parámetros de suelo de T1 (fase de acondicionamiento)

Para evaluar las posibles variaciones debidas a los tratamientos (acondicionamiento con *Jatropha*, J+/J-, y estatus endofítico: E+/E-) se realizó un análisis estadístico (ANOVA) sobre los datos obtenidos para los diferentes parámetros en T1.

Las diferencias observadas en los valores obtenidos para pH fueron significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=9.159$ $p_J<0.05$) y a la cobertura de las macetas (estatus E+ o E-) ($F_E=9.159$ $p_E<0.05$), pero no hubo diferencias significativas debido a la interacción de los factores (Fig. 2.4).

El resto de los parámetros no mostraron diferencias significativas debido a ninguno de los factores, ni a la interacción de estos. La figura 2.4 muestra los resultados obtenidos para T1 (Figs 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 y 2.9).

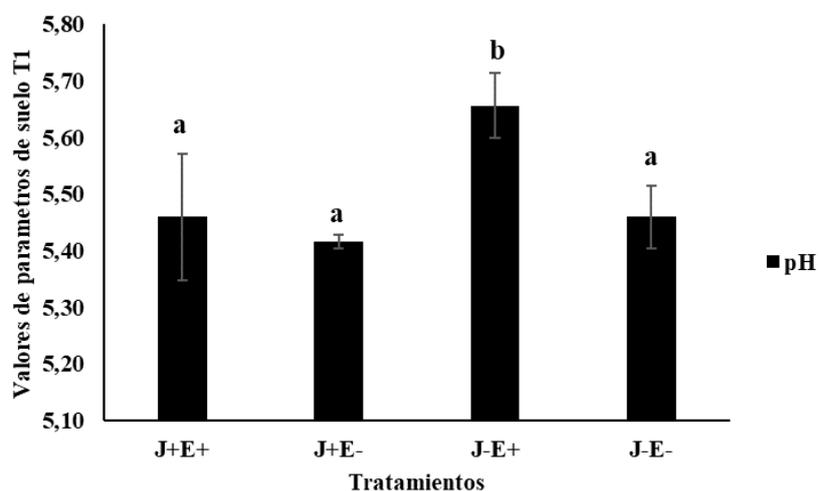


Figura 2.4: Valores obtenidos para pH (1=2.5) en T1 (luego de la fase de acondicionamiento). Letras diferentes representan diferencias significativas.

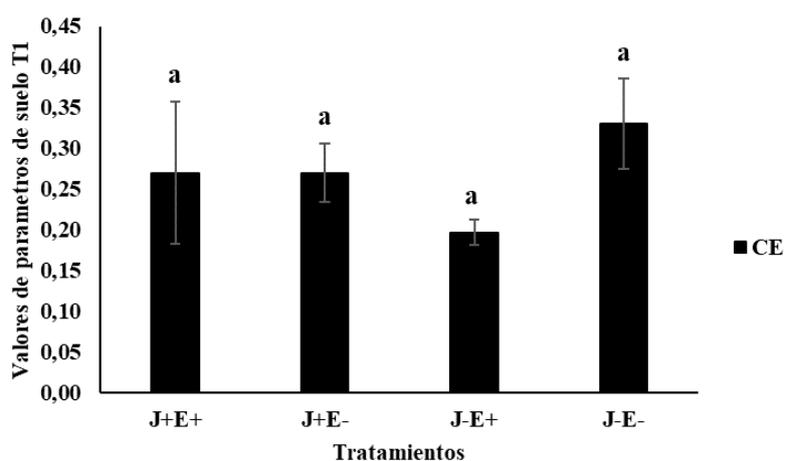


Figura 2.5: Valores obtenidos para CE (conductividad eléctrica: dS/m) en T1 (luego de la fase de acondicionamiento). Letras diferentes representan diferencias significativas.

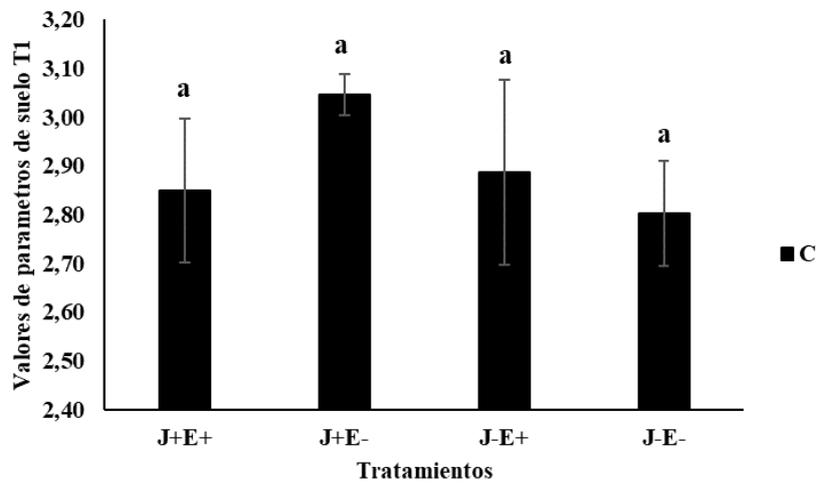


Figura 2.6: Valores obtenidos para C (carbono: %) en T1 (luego de la fase de acondicionamiento). Letras diferentes representan diferencias significativas.

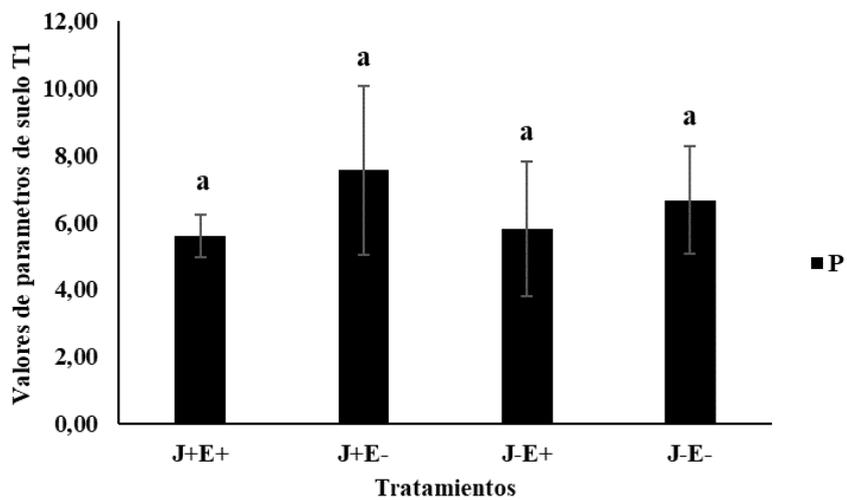


Figura 2.7: Valores obtenidos para P (fósforo: p.p.m) en T1 (luego de la fase de acondicionamiento). Letras diferentes representan diferencias significativas.

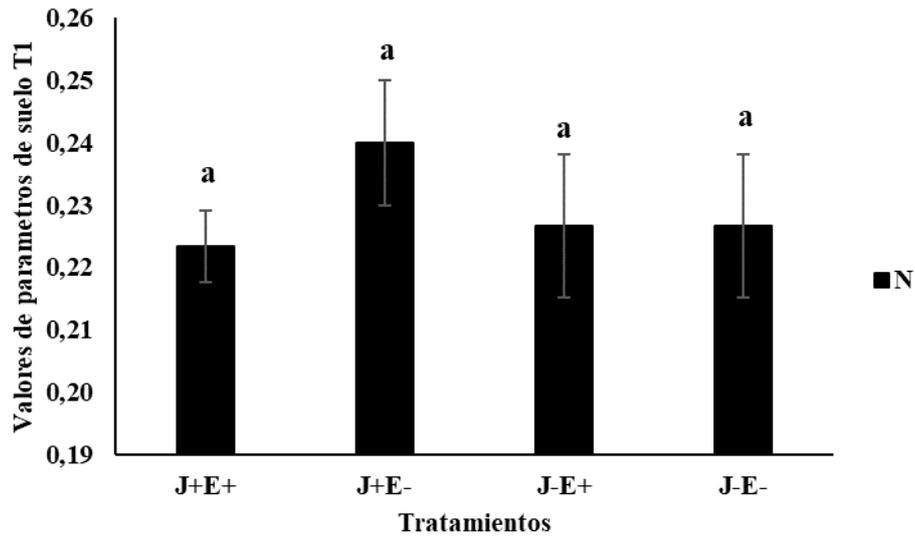


Figura 2.8: Valores obtenidos para N (nitrógeno: %) en T1 (luego de la fase de acondicionamiento). Letras diferentes representan diferencias significativas.

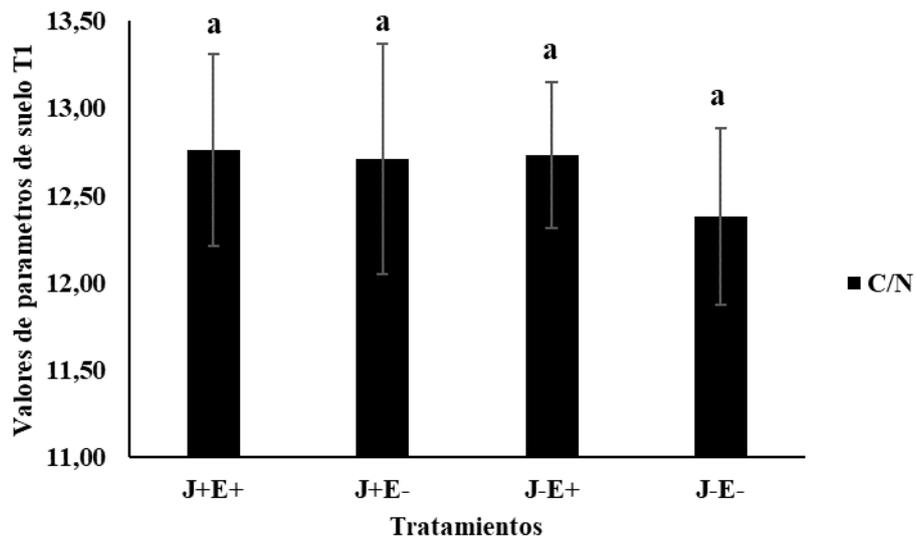


Figura 2.9: Valores obtenidos para C/N (relación carbono nitrógeno) en T1 (luego de la fase de acondicionamiento). Letras diferentes representan diferencias significativas.

Análisis de los parámetros de suelo de T2 (fase respuesta)

Análisis de suelos donde se cultivó *Jatropha curcas* como planta de segunda generación.

A continuación, se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para los parámetros de suelo obtenidos de suelos donde se cultivó *Jatropha curcas* como planta de segunda generación en la fase de respuesta.

El análisis de los datos indica que hay variaciones significativas en los valores de pH en función de la exposición o no de las macetas al medio ambiente en la fase de acondicionamiento ($F_E= 9.368$ $p_E=0.0156$). Los suelos provenientes de macetas expuestas al ambiente en la fase de acondicionamiento presentaron niveles de pH considerablemente mayores en comparación con los suelos provenientes de macetas no expuestas, independientemente de si el acondicionamiento fue realizado con o sin *Jatropha curcas* (ver Figura 2.10). En el caso del contenido de P se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos debido al acondicionamiento según la exposición al ambiente de las macetas ($F_E=7.429$, $p_E=0.026$) y a la interacción de los tratamientos (estatus endofítico y acondicionamiento con *Jatropha curcas*) ($F_{J*E}=69.073$, $p_{J*E}= 3.32e-05$). Se observó que los tratamientos J+E+Jc y J-E-Jc presentaron valores de P significativamente mayores que los tratamientos J+E-Jc y J-E+Jc. (Figura 2.11). Por otro lado, en los análisis de los valores obtenidos para CE, C y Cenizas no se observaron diferencias significativas debido a los tratamientos, ni a su interacción. Los resultados se muestran en las Figuras 2.12, 2.13 y 2.14.

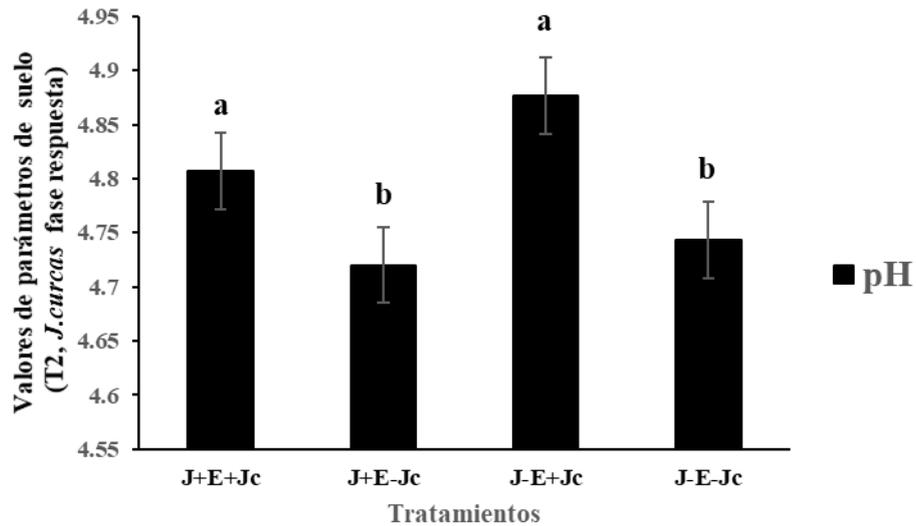


Figura 2.10: Valores de pH obtenidos en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *Jatropha curcas* como planta de segunda generación: pH (1:2,5) Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$)

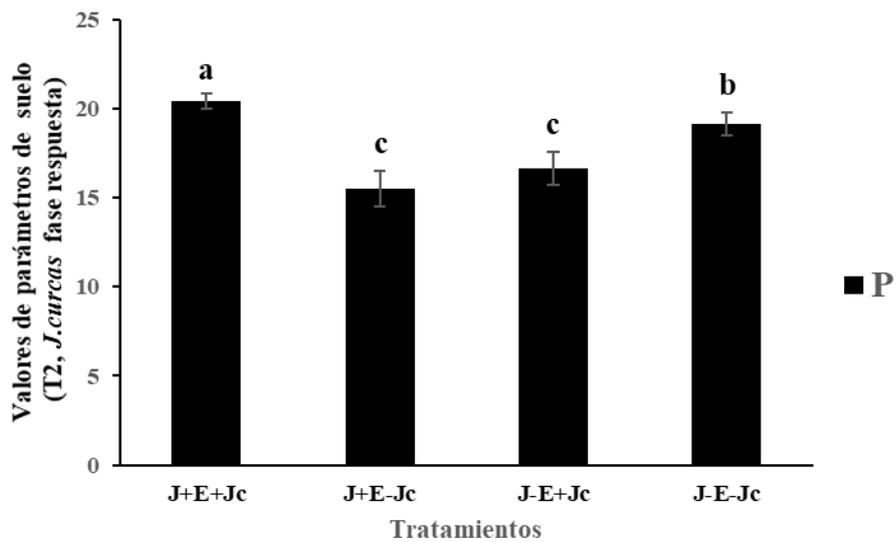


Figura 2.11: Valores de P obtenidos en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *Jatropha curcas* como planta de segunda generación: P (p.p.m.) Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$)

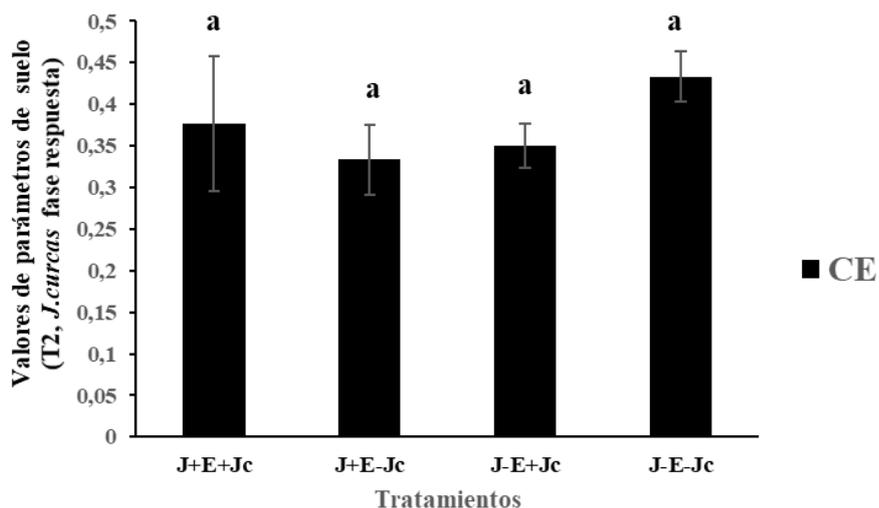


Figura 2.12: Valores obtenidos de CE en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *Jatropha curcas* como planta de segunda generación: CE (conductividad eléctrica: dS/m). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).

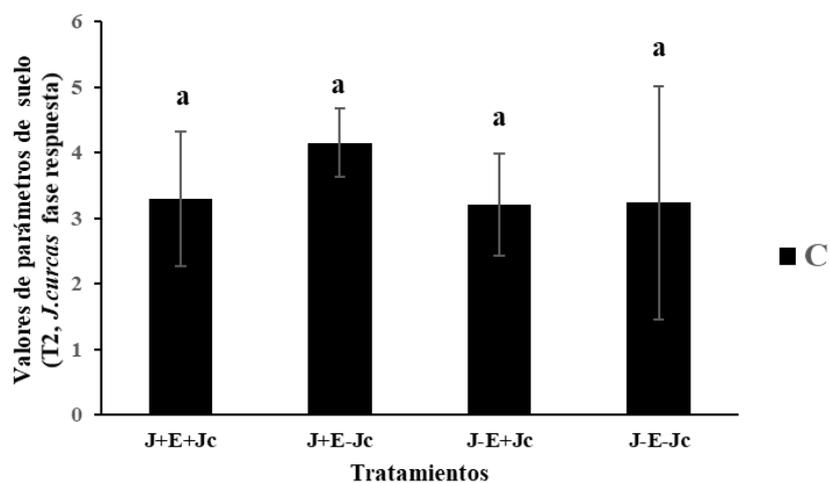


Figura 2.13: Valores obtenidos de C en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *Jatropha curcas* como planta de segunda generación: C (carbono %). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).

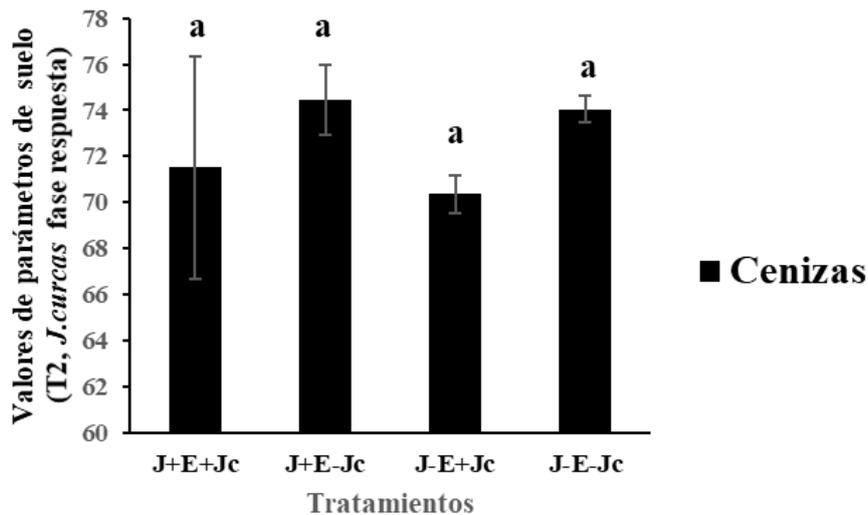


Figura 2.14: Valores obtenidos de Cenizas en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *Jatropha curcas* como planta de segunda generación: Cenizas (%). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$)

Análisis de suelos donde se cultivó *Jacaranda mimosifolia* como planta de segunda generación

A continuación, se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para los parámetros de suelo obtenidos de suelos donde se cultivó *Jacaranda mimosifolia* como planta de segunda generación en la fase de respuesta.

El análisis de los valores obtenidos para pH, P y C en esta etapa, reveló que no hubo cambios significativos debido a los tratamientos ni a la interacción de estos (Figura 2.15, 2.16 y 2.17). Por otro lado, el análisis de los valores obtenidos para CE reveló que existen diferencias significativas debido a la interacción de los tratamientos ($F_{J*E} = 11.640$, $p_{J*E} = 0.0092$), donde los valores obtenidos de suelos cuyo acondicionamiento había sido J-E+Jm resultaron significativamente mayores a aquellos provenientes de suelos cuyo acondicionamiento fue J-E-Jm (Figura 2.18). A su vez, el análisis del contenido de Cenizas reveló que existen diferencias significativas debido al acondicionamiento con

Jatropha curcas ($F_J=5.17$, $p_J=0.05$) y a la interacción entre tratamientos ($F_{J*E}= 27.941$, $p_{J*E}=0.0007$). Los valores obtenidos para suelos J-E-Jm resultaron significativamente mayores a los obtenidos en suelos J-E+Jm y J+E-Jm (Fig. 2.19).

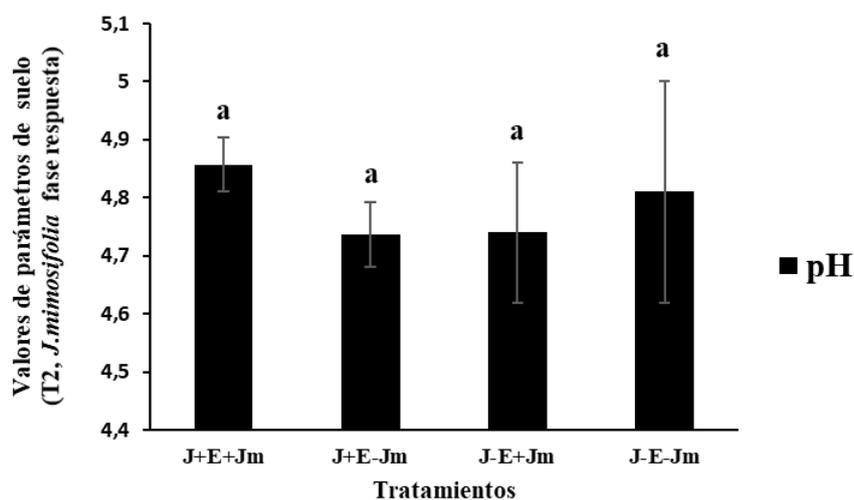


Figura 2.15: Valores obtenidos de pH en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *J. mimosifolia* como planta de segunda generación: pH (1:2,5) Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p<0,05$)

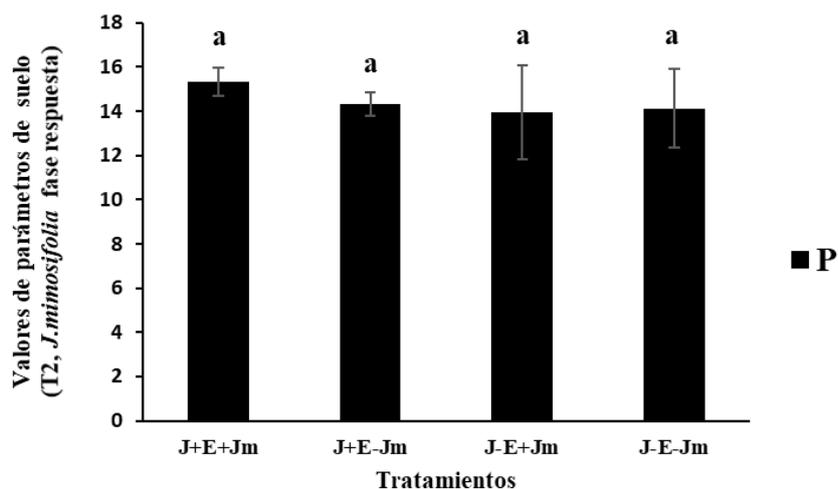


Figura 2.16: Valores obtenidos de P en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *J. mimosifolia* como planta de segunda generación: P (p.p.m.). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p<0,05$)

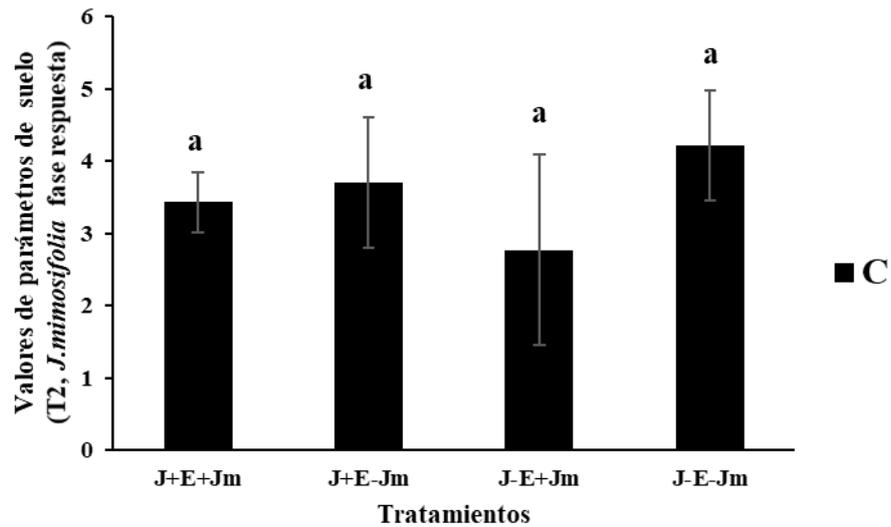


Figura 2.17: Valores obtenidos de C en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *J. mimosifolia* como planta de segunda generación: C (carbono %). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$)

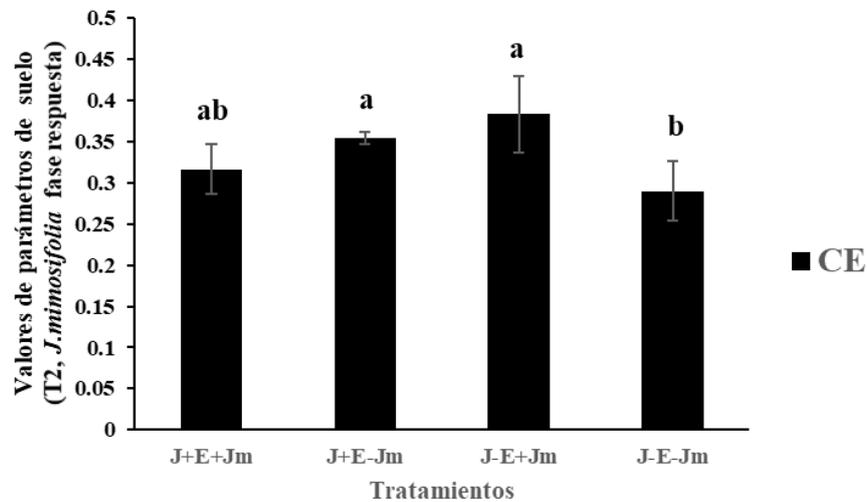


Figura 2.18: Valores obtenidos de CE en T2 (fase respuesta) para suelos donde creció *J. mimosifolia* como planta de segunda generación: CE (conductividad eléctrica: dS/m). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).

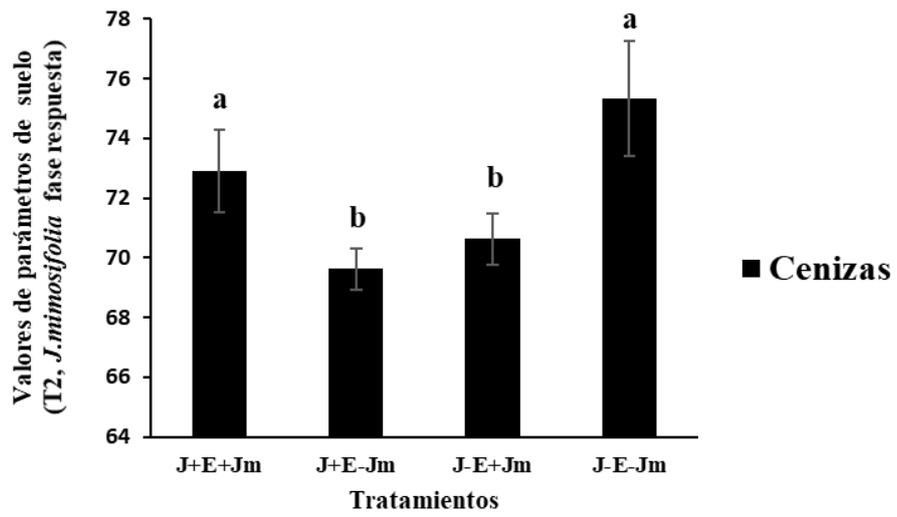


Figura 2.19: Valores obtenidos de contenido de Cenizas (%) en T2. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$)

**Análisis de biomasa y crecimiento vegetal de las plantas en la fase respuesta
(Segunda generación de plantas: *Jatropha curcas* y *J mimosifolia*)**

Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento de *Jatropha curcas* en T2 (fase respuesta)

Los resultados obtenidos para LV (largo de vástagos, $F_J=0.847$, $p_J=0.364$; $F_E=1.864$, $p_E=0.181$; $F_{J*E}=1.616$; $p_{J*E}=0.212$) y LR (largo de raíces, $F_J=1.485$, $p_J=0.232$; $F_E=2.214$, $p_E=0.146$; $F_{J*E}=0.356$, $p_{J*E}=0.555$) no presentaron diferencias significativas debido a ninguno de los factores (acondicionamiento o estatus endofítico). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los factores para ninguno de estos parámetros (Figs. 2.20 y 2.21). Los valores de PFV (peso fresco de vástagos) presentaron diferencias significativas debido a acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=3.962$, $p_J=0.05$) pero no debido al estatus endofítico ni a la interacción entre factores ($F_E=3.053$, $p_E=0.0899$; $F_{J*E}=0.125$, $p_{J*E}=0.7264$) (Fig. 2.22). En el caso del análisis de PFR (peso fresco de raíces), el análisis mostró diferencias significativas debido al tratamiento con endofitos ($F_E=8.272$, $p_E=0.00761$) y a la interacción entre los factores ($F_{J*E}=8.272$, $p_{J*E}=0.03193$) pero no debido al acondicionamiento de las macetas con *Jatropha curcas* ($F_J=0.224$, $p_J=0.63949$). En particular se observó que los valores de PFR de plantas de *Jatropha curcas* provenientes de macetas cuyo tratamiento fue J-E+ fueron significativamente mayores a los valores de PFR de plantas provenientes de macetas cuyo estatus endofítico fue J-E- (Fig. 2.23).

En los casos de PSV (peso seco de vástagos) y PSR (peso seco de raíces) el análisis mostró tendencias similares. Ambas variables presentaron diferencias significativas debido al estatus endofítico ($F_E=5.132$, $p_E=0.0302$ para PSV y $F_E=6.294$, $p_E=0.0177$ para PSR),

pero no debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=1.547$, $p_J= 0.2223$ para PSV y $F_J=1.155$, $p_J= 0.2910$ para PSR) ni a la interacción entre factores ($F_{J^*E}=0.668$, $p_{J^*E}= 0.4197$ para PSV y $F_{J^*E}=4.067$, $p_{J^*E}= 0.0528$ para PSR). En ambos casos, las plantas cuyo acondicionamiento por estatus endofítico fue E+, los valores obtenidos para dichos parámetros resultaron significativamente mayores que para plantas E- (Figs. 2.24 y 2.25).

El análisis del contenido de P en plantas de *Jatropha curcas* mostró diferencias significativas debidas al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=5.626$, $p_J=0.0495$). Aunque no se observaron diferencias significativas debido al estatus endofítico ($F_E=1.083$, $p_E= 0.3326$) ni a la interacción de los factores ($F_{J^*E}=1.510$, $p_{J^*E}=0.2589$). Se observó que el contenido de P fue significativamente mayor en plantas cuyo tratamiento fue J-E+ (Fig. 2.26).

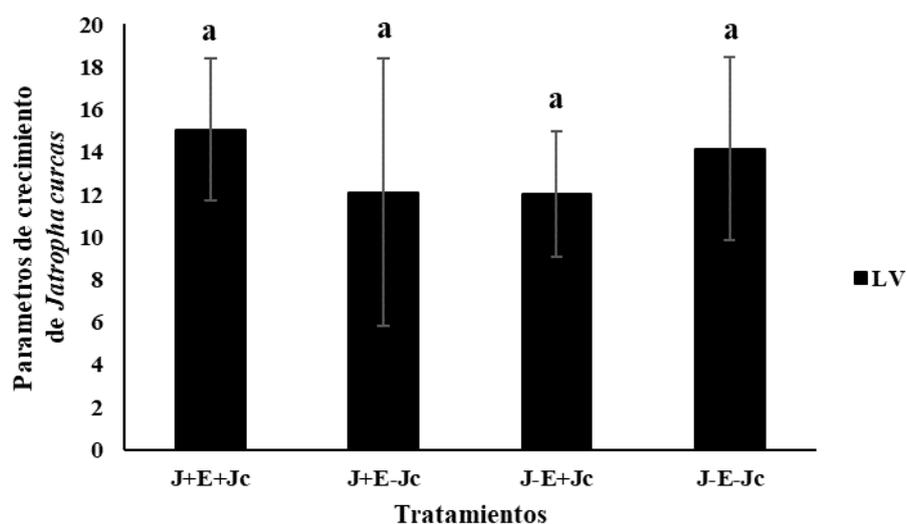


Figura 2.20: Valores obtenidos para LV (largo de vástago) de *Jatropha curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p<0,05$).

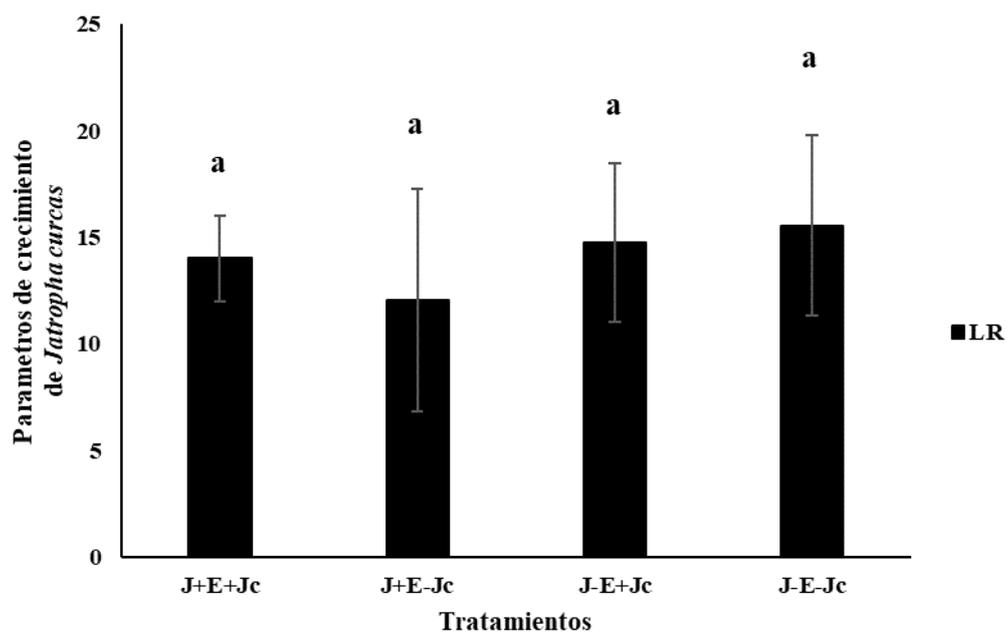


Figura 2.21: Valores obtenidos para LR (largo de raíz) de *Jatropha curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

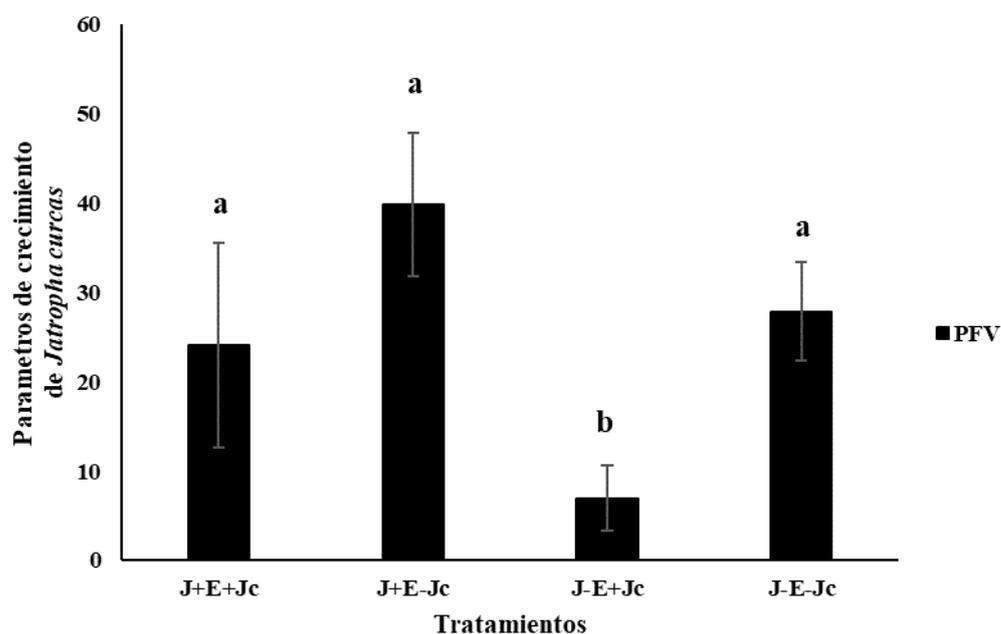


Figura 2.22: Valores obtenidos para PFV (peso fresco de vástago) de *Jatropha curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

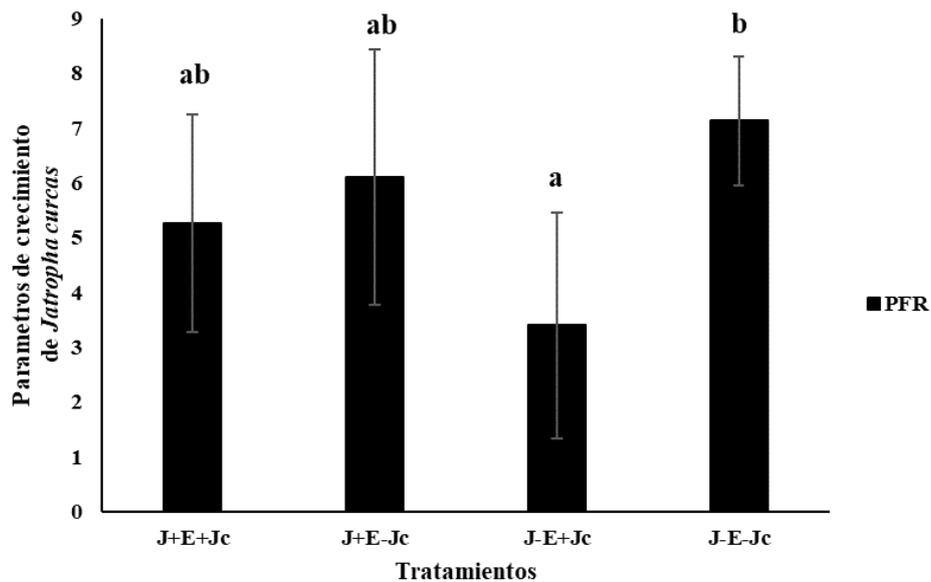


Figura 2.23: Valores obtenidos para PFR (peso fresco de raíz) de *Jatropha s curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

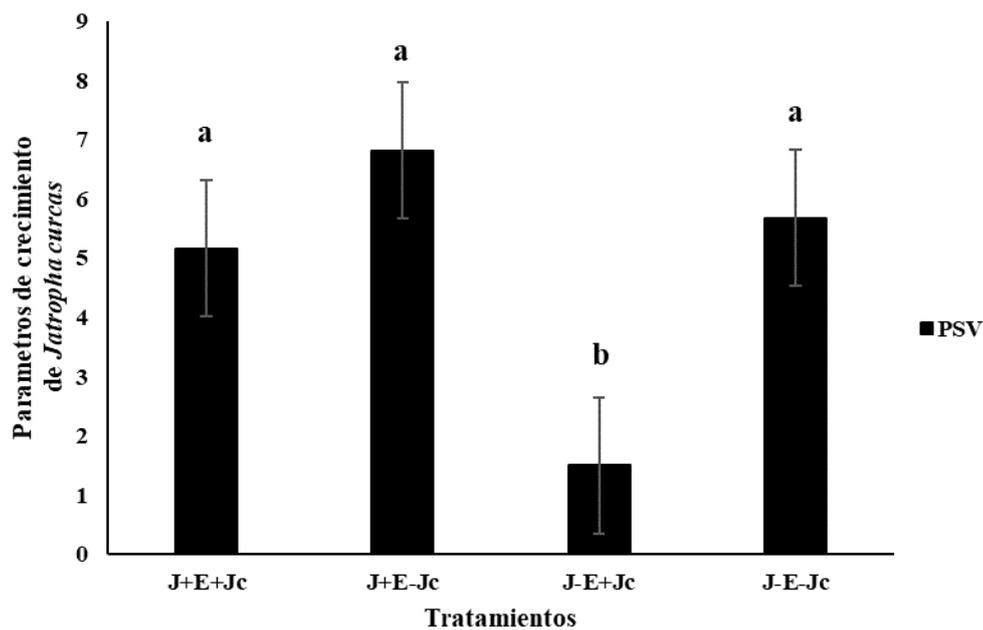


Figura 2.24: Valores obtenidos para PSV (peso seco de vástago) de *Jatropha curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

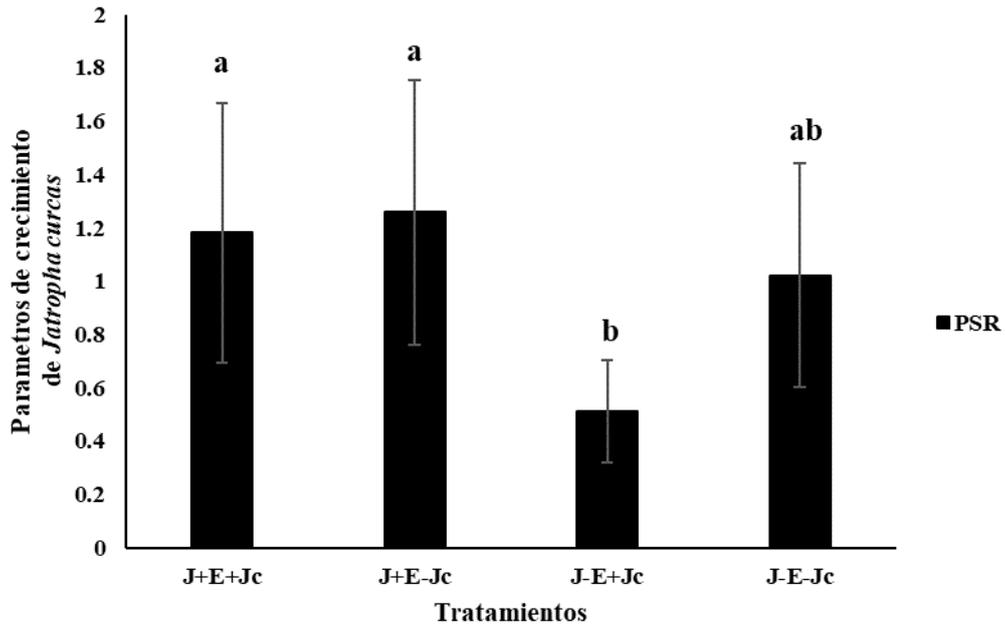


Figura 2.25: Valores obtenidos para PSR (peso seco de raíz) de *Jatropha curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

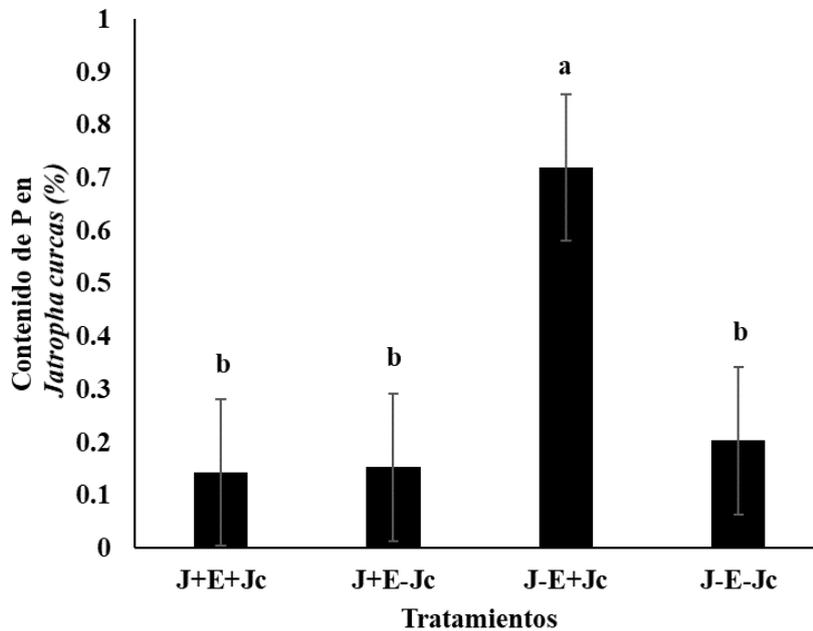


Figura 2.26: Valores obtenidos para contenido de fósforo (P, %) en plantas de *Jatropha curcas* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento de *Jacaranda mimosifolia* en T2 (fase respuesta)

Los resultados obtenidos para el análisis de LV (largo de vástago) de *J. mimosifolia* (Fig. 2.27) presentaron diferencias significativas debido al acondicionamiento del suelo con *Jatropha curcas* ($F_J=20.491$, $p_J=7e-05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas debido al estatus endofítico ($F_E=3.159$, $p_E=0.0845$) y tampoco debido a la interacción de los factores ($F_{J*E}=0.488$, $p_{J*E}=0.4896$). Se observó que los valores de LV obtenidos en macetas cuyo tratamiento fue J+ son significativamente mayores que los valores de LV de plantas cuyo tratamiento fue J-. En el caso de LR (largo de raíz), los resultados no presentaron diferencias significativas debido a ninguno de los factores ni a la interacción de estos ($F_J=1.714$, $p_J=0.1992$; $F_E=0.736$, $p_E=0.3970$ y $F_{J*E}=3.196$, $p_{J*E}=0.0827$) (Fig. 2.28).

El análisis de PFV (peso fresco de vástagos) reveló que existen diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=22.571$, $p_J=3.61e-05$) y al estatus endofítico de las mismas ($F_E=9.612$, $p_E=0.00387$), pero no se observó interacción significativa entre los factores ($F_{J*E}=1.028$, $p_{J*E}=0.31782$). Plantas cuyo tratamiento fue J+E- presentaron valores de PFV significativamente mayores al resto de los tratamientos (Fig. 2.29). En el caso de PFR (peso fresco de raíces) los resultados presentaron diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=13.811$, $p_J=0.000747$), pero no se observaron diferencias significativas debido al estatus endofítico de las plantas ($F_E=3.773$, $p_E=0.060657$) ni a la interacción de los factores ($F_{J*E}=0.065$, $p_{J*E}=0.800569$). Plantas cuyo tratamiento fue J-E+ presentaron resultados significativamente menores al resto de los tratamientos (Fig. 2.30).

Los resultados obtenidos para PSV (peso seco de vástagos) presentaron diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=26.394$, $p_J= 1.73e-05$), mientras que no se observaron diferencias significativas debido al acondicionamiento según el estatus endofítico ($F_E=2.048$, $p_E=0.163$) ni a la interacción de los factores ($F_{E*J}=0.008$, $p_{E*J}=0.931$) (Fig. 2.31). Este patrón se repitió en el caso de PSR (peso seco de raíces), donde los resultados presentaron diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($F_J=12.838$, $p_J=0.00108$) y no se observaron diferencias significativas debido al estatus endofítico de las macetas ($F_E=1.474$, $p_E=0.23326$) ni a la interacción de los factores ($F_{J*E}= 0.042$, $p_{J*E}= 0.83858$) (Fig. 2.32).

El contenido de P en plantas de *J. mimosifolia* no presentó diferencias significativas debido a ninguno de los tratamientos ni a la interacción de estos ($F_J= 1.823$, $p_J= 0.214$; $F_E= 0.101$, $p_E= 0.759$ y $F_{J*E}= 1.823$, $p_{J*E}= 0.214$) (Fig. 2.33).

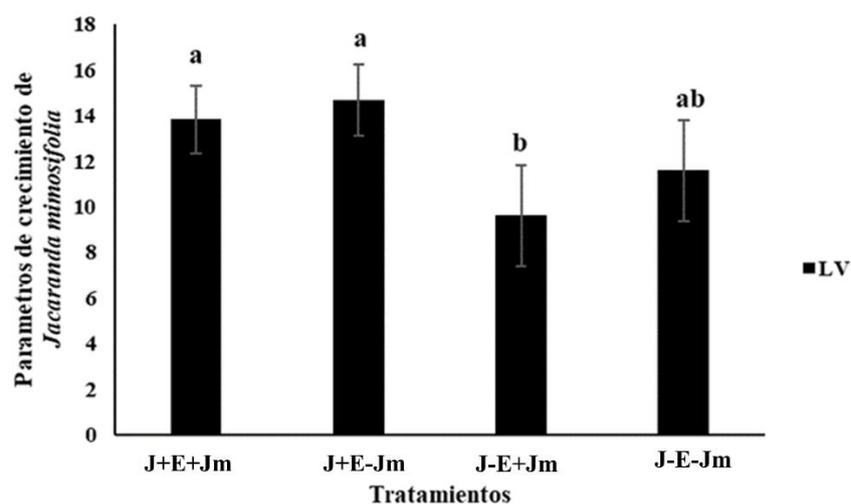


Figura 2.27: Valores obtenidos para LV (largo de vástago) de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p<0,05$).

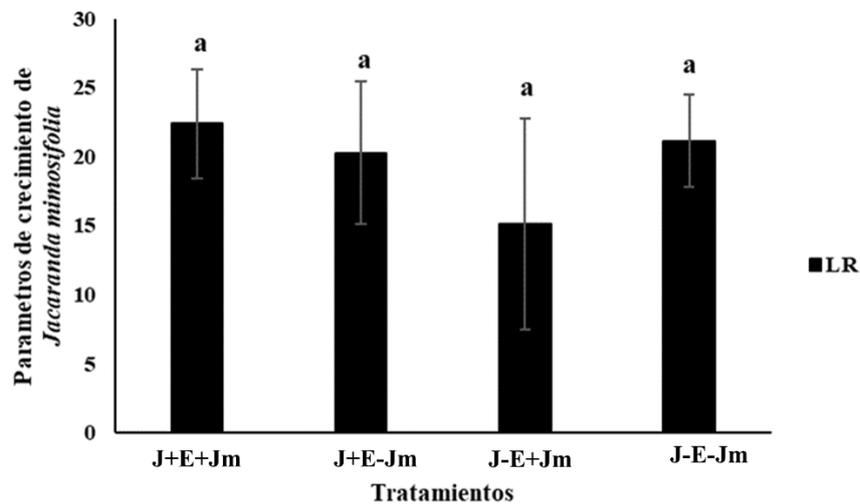


Figura 2.28: Valores obtenidos para LR (largo de raíz) de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

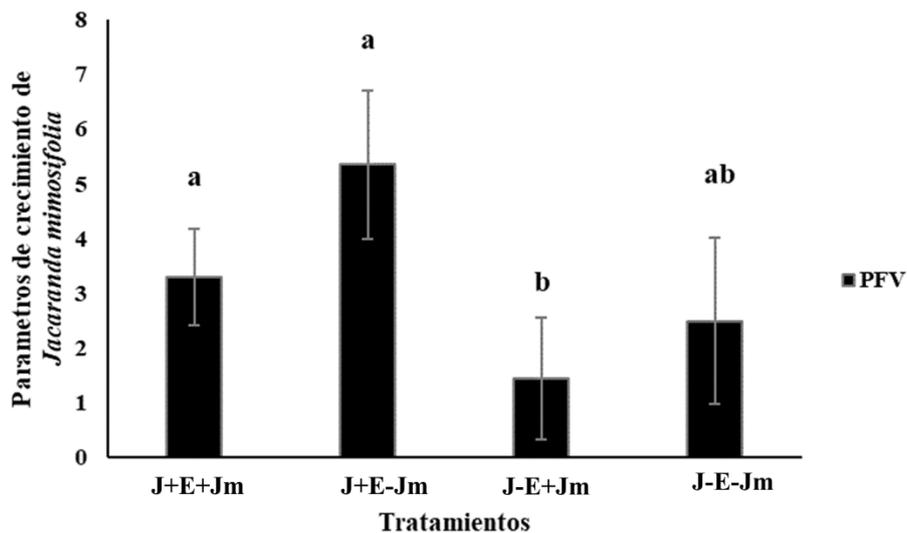


Figura 2.29: Valores obtenidos para PFV (peso fresco de vástago) de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

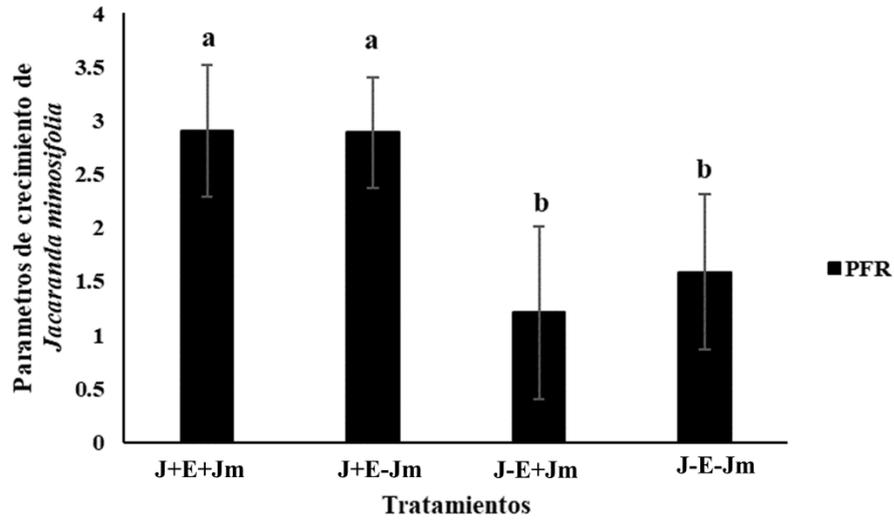


Figura 2.30: Valores obtenidos para PFR (peso fresco de raíz) de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

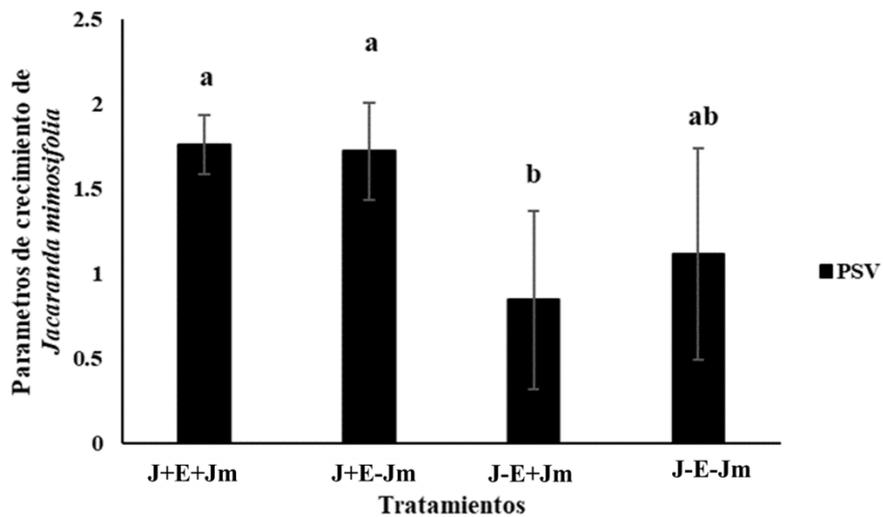


Figura 2.31: Valores obtenidos para PSV (peso seco de vástago) de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

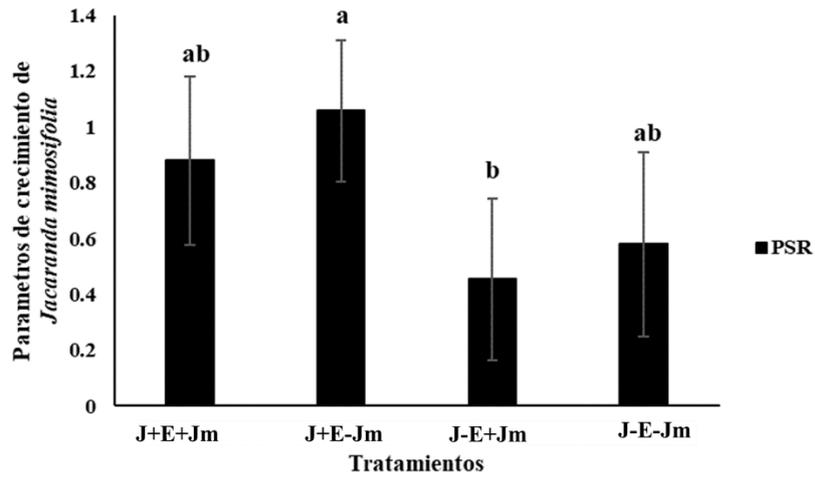


Figura 2.32: Valores obtenidos para PSR (peso seco de raíz) de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2). Letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$).

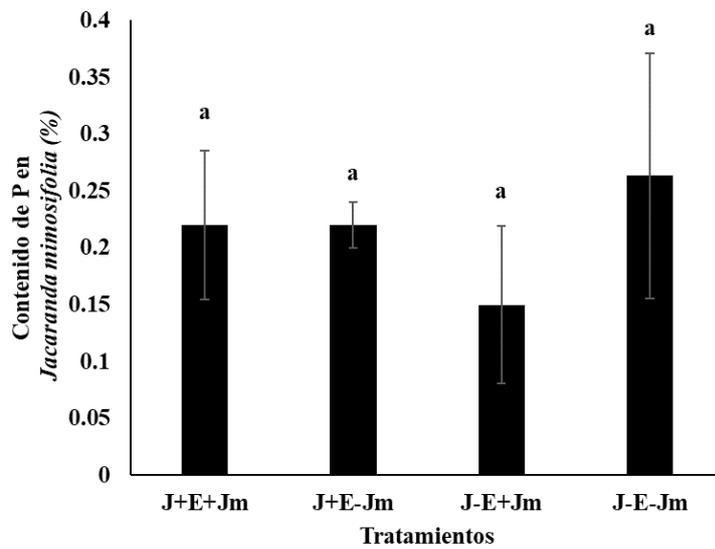


Figura 2.33: porcentaje (%) de P (fósforo) en plantas de *Jacaranda mimosifolia* en la fase respuesta (T2) (ANOVA, $p < 0,05$).

Análisis de hongos rizosféricos en T2 (fase respuesta)

Análisis de las UFC rizosféricas asociadas a *Jatropha curcas*

Los resultados obtenidos a partir de los recuentos de UFC a partir de medio MEA (Fig. 2.34) de suelos donde *Jatropha curcas* fue la planta de segunda generación revelaron que existen diferencias significativas debido a la interacción de los factores ($L= 35.95$, $\chi^2=1.56e-08$). En coincidencia con esto, en los recuentos de UFC realizados a partir del medio de cultivo DRBC se observaron diferencias significativas debido a la presencia de endofitos en la fase acondicionamiento de las macetas ($L= 8.68$, $\chi^2=0.003$) (Fig. 2.35). En ambos casos el tratamiento J+E+Jc registró los menores recuentos. Por otro lado, los recuentos de UFC con capacidad para solubilizar fósforo revelaron resultados similares, donde las diferencias significativas se debieron a la presencia de endofitos ($Z=2.42$, $p=0.015$), y donde los mayores recuentos se registraron en los tratamientos J+E-Jc y J-E-Jc (Fig 2.36).

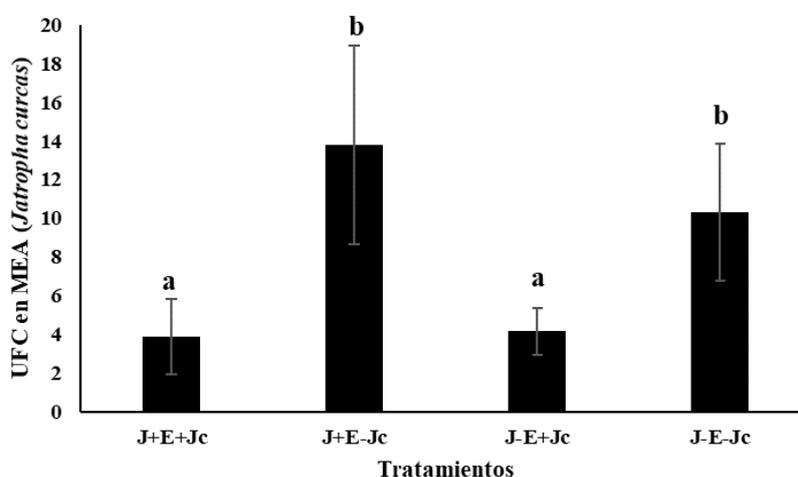


Figura 2.34: Recuentos de UFC (unidades formadoras de colonia) obtenidas a partir del medio de cultivo MEAch para muestras de suelo de tomadas de macetas donde la planta de segunda generación en la fase respuesta fue *Jatropha curcas*. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\chi^2<0.05$).

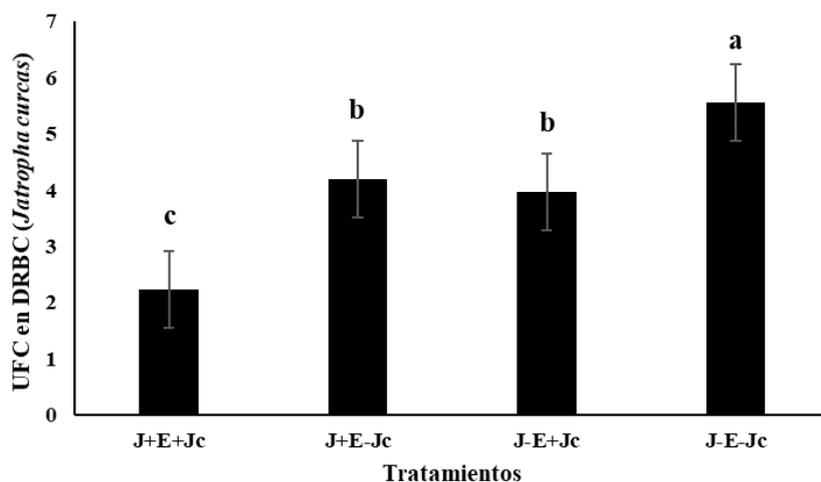


Figura 2.35: Recuentos de UFC (unidades formadoras de colonia) obtenidas a partir del medio de cultivo DRBC para muestras de suelo tomadas de macetas donde la planta de segunda generación en la fase respuesta fue *Jatropha curcas*. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\chi^2 < 0.05$).

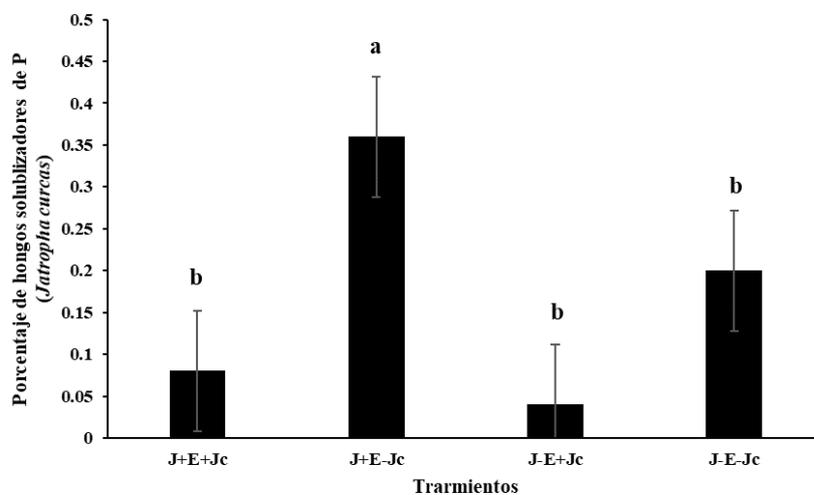


Figura 2.36: Recuentos de UFC (unidades formadoras de colonia) de hongos solubilizadores de fósforo obtenidas a partir del medio de cultivo NBRIP para muestras de suelo tomadas de macetas donde la planta de segunda generación en la fase respuesta fue *Jatropha curcas*. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\chi^2 < 0.05$).

Análisis de las UFC rizosféricas asociada a *Jacaranda mimosifolia*

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el recuento de UFC a partir del medio de cultivo MEA reveló que existen diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($L= 24.34, \chi^2= 8.05e-07$), al estatus endofítico ($L= 10.61, \chi^2=0.001$) y a la interacción ($L=13.99, \chi^2= 0.001$). Se observó que el tratamiento J+E+Jm obtuvo los mayores recuentos de UFC, mientras que J-E-Jm obtuvo los menores recuentos de UFC en este medio de cultivo (Fig. 2.37).

Los recuentos de UFC a partir del medio de cultivo DRBC, mostraron que existen diferencias significativas debido al acondicionamiento de macetas con *Jatropha curcas* ($L= 3.11, \chi^2=8.70e-09$), siendo el tratamiento J+E+Jm del que se obtuvieron los mayores recuentos (Fig. 2.38). La misma tendencia se observó para las UFC con la capacidad de solubilizar fósforo, a partir de los hongos obtenidos del medio DRBC y testeados en medio NBRIP. Se observó que existen diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($L= 24.52, \chi^2=7.34e-07$). Se observó además, que los mayores valores de recuentos de UFC se presentan en los tratamientos J+E+Jm y J+E-Jm (Fig. 2.39).

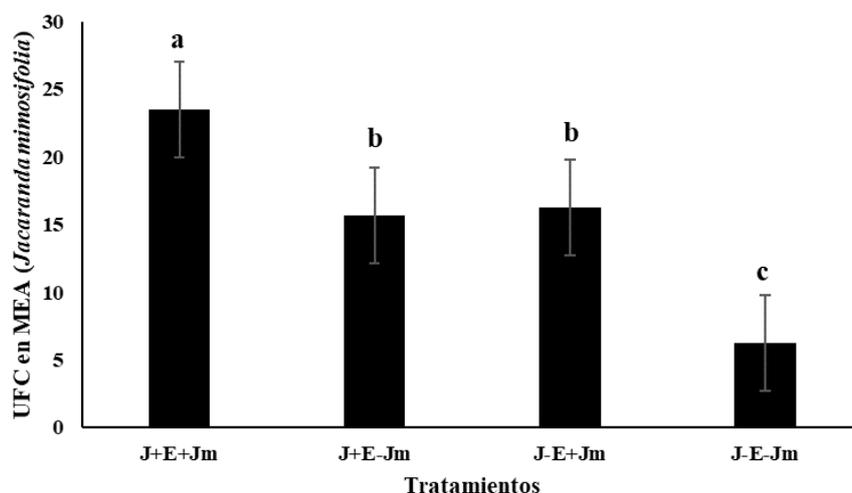


Figura 2.37: Recuentos de UFC (unidades formadoras de colonia) obtenidas a partir del medio de cultivo MEACh para muestras de suelo tomadas de macetas donde la planta de segunda generación en la fase respuesta fue *Jacaranda mimosifolia*. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\chi^2 < 0.05$).

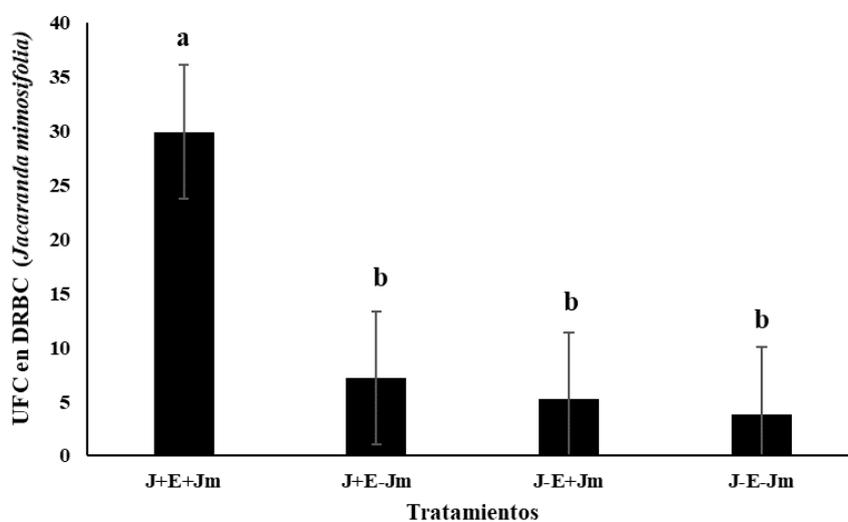


Figura 2.38: Recuentos de UFC (unidades formadoras de colonia) obtenidas a partir del medio de cultivo DRBC para muestras de suelo tomadas de macetas donde la planta de segunda generación en la fase respuesta fue *Jacaranda mimosifolia*. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\chi^2 < 0.05$).

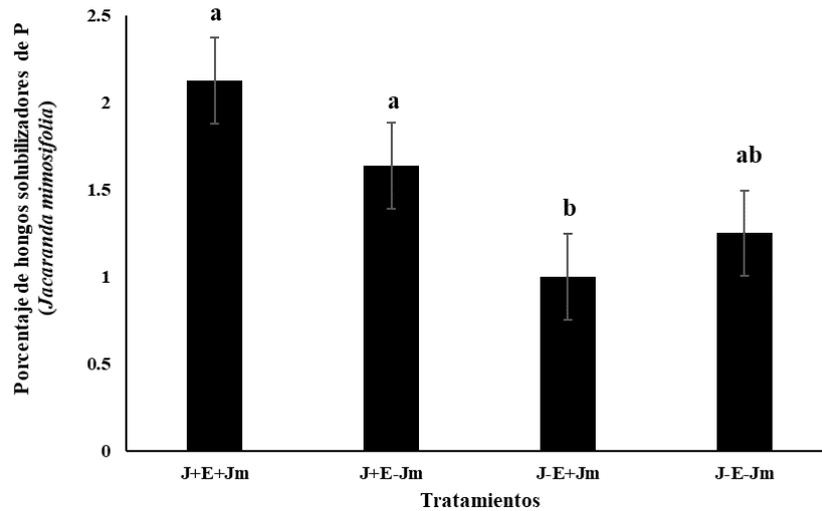


Figura 2.39: Recuentos de UFC (unidades formadoras de colonia) de hongos solubilizadores de fosforo obtenidas a partir del medio de cultivo NBRIP para muestras de suelo tomadas de macetas donde la planta de segunda generación en la fase respuesta fue *Jacaranda mimosifolia*. Letras diferentes representan diferencias significativas ($\chi^2 < 0.05$).

Análisis de la colonización micorrícica en T2 (fase respuesta)

Análisis de micorrizas en *Jatropha curcas*

Análisis de micorrización total

El análisis de los datos obtenidos a partir del recuento total de estructuras micorrícicas en raíces de *Jatropha curcas* revelaron que existen diferencias significativas debidas al tratamiento con endofitos ($L_r = 12.87$, $X^2 < 0.05$) y que hubo interacción significativa entre los factores ($L_r = 14.49$, $X^2 < 0.05$) pero no se detectaron diferencias significativas debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas*.

La mayor abundancia de micorrizas totales se observó en el tratamiento J+E-Jc, y fue significativa con el resto de los tratamientos. Entre los tratamientos J-E+Jc y J-E-Jc no se observaron diferencias significativas, pero sí entre estos y el resto de los tratamientos (J+E+Jc y J+E-Jc) (Fig. 2.40).

Análisis de arbusculos

El análisis de los datos obtenidos a partir de la abundancia de arbusculos a partir de raíces de *Jatropha curcas* revelaron que existen diferencias significativas debidas al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($Pr=37.7$, $X^2<0.05$) y la existencia de interacción significativa entre los factores ($Pr= 91.44$, $X^2<0.05$), pero no hubo diferencias significativas debidas al tratamiento con endofitos.

Se observó una mayor abundancia de arbusculos en el tratamiento J+E-Jc. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos J+E+Jc, J+E-Jc y J-E-Jc, pero en el tratamiento J-E+Jc se observaron diferencias significativas con respecto a los otros tres tratamientos (Figura 2.40).

Análisis de vesículas

El análisis de los resultados del recuento de vesículas reveló que existen diferencias significativas debidas al tratamiento con endofitos ($LR=158.4$, $X^2<0.05$), al acondicionamiento con *Jatropha curcas* ($LR=142.94$, $X^2<0.05$), y que la interacción de los factores fue significativa ($LR=276.73$, $X^2<0.05$).

La mayor abundancia de vesículas se observó en el tratamiento J-E+Jc. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos J+E+Jc, J-E+Jc, y entre estos dos tratamientos con respecto a los tratamientos J+E-Jc y J-E-Jc. Entre estos dos últimos no se observaron diferencias significativas (Fig 2.40).

Análisis de coils

El análisis de los datos obtenidos del recuento de coils en las raíces de *Jatropha curcas* reveló que existen diferencias significativas debido al acondicionamiento con endofitos ($Lr= 4.86$, $X^2 < 0.05$) y que hubo una interacción significativa entre los factores ($LR=10.44$, $X^2 < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas debidas al acondicionamiento con *Jatropha curcas*.

La abundancia de coils resultó significativamente mayor en el tratamiento J-E+Jc que en el resto de los tratamientos (Fig. 2.40).

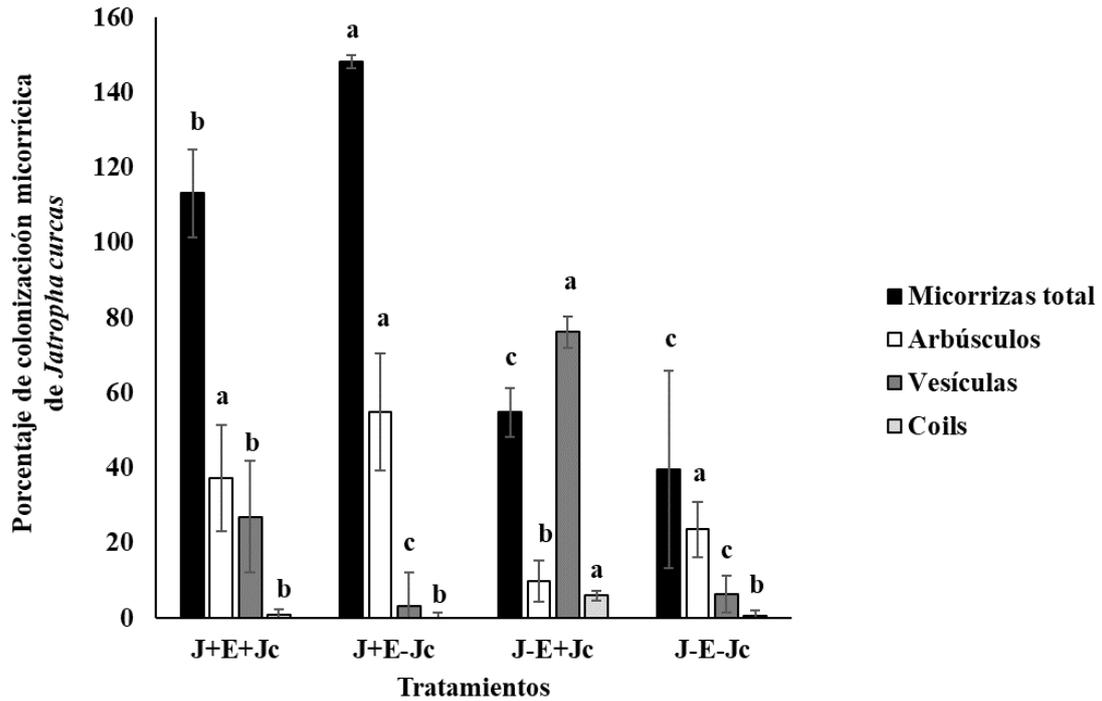


Figura 2.40: Porcentaje de colonización micorrícica en raíces de *Jatropha curcas* para plantas acondicionadas (J+) o no (J-) con *Jatropha curcas*, y con (E+) o sin (E-) colonización endofítica. Se muestran los porcentajes de micorrización total, arbúsculos, vesículas y coils. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

Análisis de micorrizas en *Jacaranda mimosifolia*

Análisis de la micorrización total

El análisis de los datos obtenidos a partir del recuento total de estructuras micorrícicas en raíces presentes en raíces de *J. mimosifolia* revelaron que existen diferencias significativas debidas al tratamiento con endofitos ($Lr= 7.98$, $X^2=0.005$) pero no debido al acondicionamiento con *Jatropha curcas*. Se detectó interacción significativa entre los

factores ($Lr= 10.35$, $X^2=0.016$). El tratamiento J+E-Jm no presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Fig. 2.41).

Análisis de arbúsculos

El análisis de los datos obtenidos a partir del recuento de arbúsculos a partir de raíces de *J. mimosifolia* reveló que no existen diferencias significativas debidas a los factores. Sin embargo, en el tratamiento J+E+Jm se observó una mayor abundancia que en el resto de los tratamientos (Fig. 2.41).

Análisis de Vesículas

El análisis de los resultados obtenidos para el recuento de vesículas a partir de raíces de *J. mimosifolia*, reveló que existen diferencias significativas debidas al tratamiento con endofitos ($LR=8.4$, $X^2=0.0037$), asociado a mayores valores de este parámetro y que la interacción de los factores fue significativa ($LR=8.65$, $X^2=0.03$).

Las comparaciones múltiples revelan que la abundancia de vesículas en los tratamientos J+E+Jm y J-E+Jm fue significativamente mayor a la abundancia observada en los tratamientos J+E-Jm y J-E-Jm (Fig. 2.41).

Análisis de Coils

El análisis de los datos obtenidos a partir del recuento de coils a partir de raíces de *J. mimosifolia* reveló que existen diferencias debidas al tratamiento con endofitos (Lr= 186.8, $X^2 < 0.05$), al acondicionamiento con *Jatropha curcas* (LR=21.71, $X^2 < 0.05$) y a la interacción de los tratamientos (Lr= 195.43, $X^2 < 0.05$).

Las comparaciones múltiples revelaron que la abundancia de coils presentes en raíces de *J. mimosifolia* cuyo tratamiento fue J-E+ fue significativamente mayor a los obtenidos a los demás tratamientos, seguida por el tratamiento J+E+Jm y por J-E-Jm (Fig. 2.41).

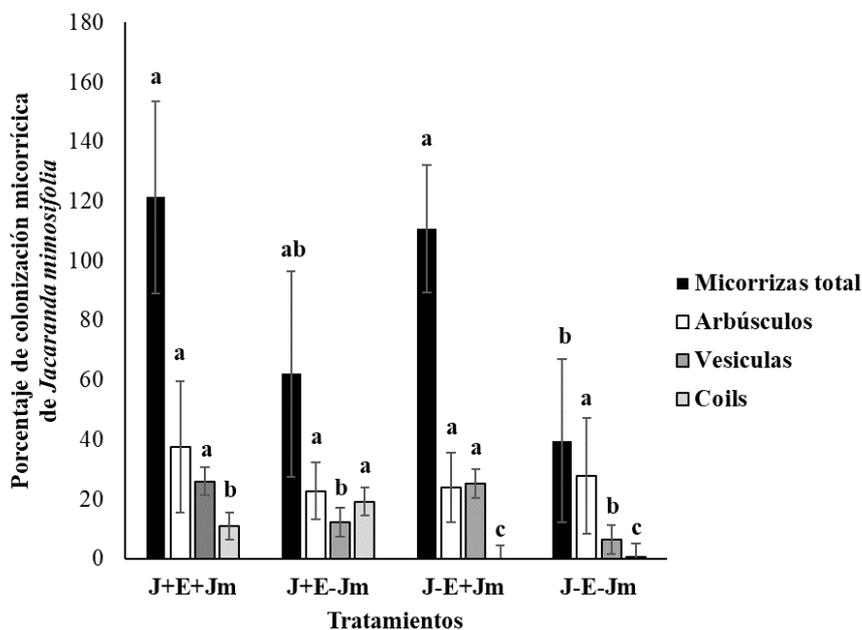


Figura 2.41: Porcentaje de colonización micorrícica en raíces de *Jacaranda mimosifolia* para plantas acondicionadas (J+) o no (J-) con *Jatropha curcas*, y con (E+) o sin (E-) colonización endofítica. Se muestran los porcentajes de micorrización total, arbúsculos, vesículas y coils. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

2.5. Discusión

En este capítulo se partió de la hipótesis de que *Jatropha curcas* establece procesos de retroalimentación positiva con el suelo.

Para poder aceptar o refutar dichas hipótesis, se evaluaron los efectos de la retroalimentación planta- suelo sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *Jatropha curcas* cultivadas en suelo acondicionado con plantas de su misma especie, colonizadas o no con endofitos foliares. Además, se evaluó el impacto de suelos acondicionados con *Jatropha curcas* sobre el crecimiento y desarrollo de plantas nativas de la especie *Jacaranda mimosifolia*.

En primer lugar, se evaluó la presencia/ausencia de endofitos en hojas de *Jatropha curcas*, a fin de corroborar el estatus endofítico de las plantas en la etapa de acondicionamiento de suelo. En este sentido los resultados mostraron que la cobertura de las plantas, como método de protección frente a los posibles inóculos presentes en el ambiente, fue exitoso, mostrando que plantas E- presentaron un porcentaje significativamente menor de colonización endofítica que plantas E+. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el capítulo 1. Teniendo en cuenta que en esta etapa no se trabajó con suelo estéril, la presencia de endofitos en plantas E- pudo deberse principalmente al inóculo proveniente del suelo de las macetas. Este origen de la infección ya ha sido reportado en trabajos previos, donde las plantas estudiadas presentan infección endofítica debido a inóculo presente en el suelo utilizado para cultivos en invernaderos, o en exteriores (Bhai et al., 2019; Punja et al., 2019).

En este capítulo, al igual que en el capítulo 1, *Alternaria* resultó ser el género de hongo endofítico mayoritario (figura 2.2). Este género también ha sido reportado en un trabajo previo como endofito en la especie *Jatropha curcas heynei*, sin embargo, a diferencia de

este estudio, obtuvieron una frecuencia porcentual menor a la que presentaron otros géneros de hongos endofíticos como *Cladosporium*, *Curvularia* y *Penicillium*, entre otros (Ashoka et al., 2022).

Para tener una visión integral de los factores que influyen en la retroalimentación, también se evaluaron los cambios en los parámetros de suelo en las distintas etapas del ensayo.

A lo largo del ensayo de la fase de acondicionamiento de suelo (T1), aun en los tratamientos donde no hubo plantas (J-), hubo un aumento significativo en los valores de pH. Se detectó una relación interesante entre el tratamiento J-E+, con valores de pH significativamente mayores que J+E+. Este resultado sugiere la posible influencia de la presencia de *Jatropha curcas* y su estatus endofítico en el equilibrio ácido-base del suelo, donde la presencia de la planta moduló el pH hacia valores más bajos (ácidos). En este sentido, existen reportes previos donde se ha detectado que plantas invasoras redujeron el pH del suelo y redujeron la absorción de fosfato por parte de las plantas, lo que puede contribuir a una mayor disponibilidad de fosfato y su posible acumulación en los suelos invadidos (Teixeira et al., 2020). En este trabajo observamos que los valores de pH aumentaron en T1 con respecto a T0, y fue significativamente mayor para el tratamiento J-E+ en la fase de acondicionamiento. Sin embargo, dado que el tratamiento J-E- mostró valores similares a los de J+, solo se puede mencionar como una tendencia.

Al examinar la fase de respuesta (T2) y considerando las plantas de segunda generación, también se observaron patrones interesantes en relación a los valores de pH. En el caso de *Jacaranda mimosifolia* como planta de segunda generación, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en el caso de *Jatropha curcas*, las diferencias significativas en los valores de pH estuvieron relacionadas principalmente a macetas que se mantuvieron expuestas. Estos resultados no siguen la tendencia observada en T1 donde

el principal efecto sobre el pH del suelo se debía principalmente a la presencia de *Jatropha curcas*. Como fue comentado anteriormente, se sabe de estudios previos, que la presencia de *Jatropha curcas* tiene la capacidad de reducir el pH de suelos (Wang et al., 2009). También se ha demostrado que la presencia de endófitos en las plantas puede afectar la liberación de compuestos orgánicos en el suelo. Algunos de estos compuestos son ácidos orgánicos que pueden acidificar el suelo y reducir su pH, aumentando la disponibilidad de nutrientes (Varga et al., 2020; Liu et al., 2022). Esto ha sido observado en estudios anteriores en especies de endófitos de gramíneas (Van Hecke et al., 2005; Mosaddeghi et al., 2021). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia de que exista una relación directa entre la presencia de endófitos foliares en *Jatropha curcas* y el aumento en los valores de pH del suelo, por lo que este trabajo representa un aporte novedoso en ese sentido.

Es importante destacar que los mecanismos exactos que contribuyen a los valores de pH más altos en suelos donde creció *Jatropha curcas* con endófitos pueden ser complejos y aún no están completamente comprendidos. Aun así, estos resultados sugieren que la especie de planta de la fase de respuesta tiene un importante impacto en el pH del suelo. Se requieren investigaciones adicionales para investigar en mayor detalle los procesos involucrados y determinar la influencia relativa de los endófitos y otros factores en la modulación del pH del suelo en este contexto específico.

En un estudio previo realizado por Arrieta et al. (2015), se encontró una asociación entre el estatus endofítico E- y la mayor abundancia de hongos solubilizadores de fósforo. Además, se observó que el estado E+ estaba relacionado con una mayor diversidad de estos hongos. En este trabajo, al estudiar el suelo donde creció *Jatropha curcas* como planta de segunda generación, se obtuvieron resultados interesantes en relación al fósforo. El tratamiento donde plantas de *Jatropha curcas* crecieron en macetas acondicionadas

con plantas E+ presentó los mayores valores de fósforo en el suelo. También encontramos una asociación entre la abundancia de organismos solubilizadores de fósforo y el estatus endofítico E- de la planta acondicionadora, así como la cobertura de las macetas donde crecieron plantas de *Jatropha curcas* no acondicionadas por la misma especie. Aunque no se evaluó la diversidad de los organismos solubilizadores en este estudio, se encontró una tendencia similar en cuanto a su abundancia.

Por otro lado, se observó que el contenido de fósforo fue mayor en las plantas de *Jatropha curcas* que crecieron expuestas al ambiente, pero sin ser acondicionadas por plantas de su misma especie (Fig. 2.26). Esto sugiere que, aunque las plantas asociadas al estatus E+ crecieron en suelos más ricos en fósforo, pero presentaron una menor abundancia de organismos solubilizadores, las plantas J-E+Jc demostraron una mayor eficiencia en la absorción de este nutriente. Esto podría estar relacionado con las interacciones establecidas entre la planta, sus endofitos y los organismos del suelo.

Según estudios previos (Silva et al., 2019; Ren et al., 2023), la conductividad eléctrica (CE) del suelo está relacionada con el contenido de sales disueltas, mientras que el contenido de cenizas refleja la presencia de materia orgánica descompuesta (C), que es una fuente de nutrientes para las plantas. En el presente estudio, no se encontró un aumento significativo en los valores de CE ni de cenizas en suelos cultivados con *Jatropha curcas* como planta de segunda generación, pero cuando se utilizó *Jacaranda mimosifolia*, se observó un aumento significativo en la CE y el contenido de cenizas en suelos no acondicionados con *Jatropha curcas*. Por otro lado, la abundancia de hongos solubilizadores de P está asociada al acondicionamiento con *Jatropha curcas*, así como la abundancia de hongos rizosféricos, que además está asociada al tratamiento E+, cuando *J. mimosifolia* es la planta de segunda generación. Una posible explicación es que la presencia de *Jatropha curcas* disminuye la salinidad del suelo, lo que pudo haber

favorecido el desarrollo de microorganismos asociados a la rizósfera de *Jacaranda mimosifolia*, aunque esto también se ve favorecido por la interacción de *Jatropha curcas* con sus endofitos, favoreciendo el establecimiento de hongos de suelo y HMA. No obstante, se requieren pruebas adicionales para respaldar esta hipótesis y comprender mejor estos procesos.

Para el caso de *Jatropha curcas* como planta de segunda generación, tanto la abundancia de hongos solubilizadores de P como la abundancia de micorrizas se vieron favorecidas por el acondicionamiento de suelos con *Jatropha curcas*, independientemente de su estatus endofítico. Estudios anteriores han demostrado que los suelos cultivados con *Jatropha curcas* presentan una disminución en la abundancia de hongos del suelo debido a un efecto de "biofumigación" inducido por la planta (Hu et al., 2019). Este efecto no se repetiría, en este caso, para los hongos solubilizadores de P, ni para la abundancia de HMA, independientemente de cual sea la planta de segunda generación, siempre que el suelo haya sido previamente acondicionado con *Jatropha curcas*. La presencia de *Jatropha curcas* como planta acondicionadora de suelo tiene un efecto significativo en la disponibilidad de nutrientes y en la abundancia de hongos solubilizadores de fósforo y HMA.

Al analizar los parámetros de crecimiento de las plantas en la fase de respuesta, se observó lo siguiente: cuando la planta de segunda generación era de la misma especie que la planta acondicionadora (*Jatropha curcas*), se observó un mayor desarrollo vegetal en términos de peso seco de las raíces y los vástagos, independientemente de su estatus endofítico.

En el caso de *Jacaranda mimosifolia* como planta de segunda generación, se observaron incrementos significativos en la longitud, peso fresco y peso seco de los vástagos y las raíces cuando las plantas se cultivaron en suelos acondicionados con *Jatropha curcas*.

Este resultado sugiere que el acondicionamiento del suelo con una planta diferente, en este caso exótica e invasora como *Jatropha curcas*, y con colonización endofítica antes de la siembra, favorece el aumento de la biomasa vegetal en *Jacaranda mimosifolia*.

Aunque no existen estudios específicos sobre estas dos especies vegetales, hay investigaciones que utilizan modelos diferentes de plantas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Van Grunsven y colaboradores (2007) en Países Bajos, se observó que el acondicionamiento del suelo provocó un mayor incremento en la biomasa de especies de plantas exóticas (*Heracleum mantegazzianum*, *Tragopogon dubius* y *Eragrostis pilosa*) en comparación con las especies nativas coexistentes (*Heracleum sphondylium*, *Tragopogon pratensis* y *Poa annua*).

Los resultados expuestos en este trabajo confirman la presencia de retroalimentación positiva para *Jatropha curcas*, aunque no indican que este proceso esté influenciado por las comunidades endofíticas asociadas. Por otro lado, se observa que el acondicionamiento del suelo con *Jatropha curcas* promueve el desarrollo de otras especies, en particular *Jacaranda mimosifolia*, sugiriendo que la implantación de cultivos de *Jatropha curcas* no comprometería los suelos para el desarrollo de plantas nativas. Estos resultados aportan datos valiosos para la evaluación de la sustentabilidad de la implantación de cultivos de *Jatropha curcas* como especie para la obtención de biocombustibles de segunda generación.

Este estudio refuerza la idea de que las especies vegetales y su asociación a endofitos, pueden tener efectos variados en los parámetros del suelo, en el crecimiento vegetal, en las comunidades rizosféricas y en la colonización micorrícica. Aunque para comprender mejor los mecanismos subyacentes y las implicaciones de las interacciones entre planta-endofitos-suelo, especialmente cuando se utilizan plantas exóticas e invasoras que tienen

la capacidad de modular su entorno, se requieren investigaciones adicionales. Estas investigaciones son fundamentales para profundizar en el conocimiento del desarrollo de las plantas y la salud del suelo en relación con estas interacciones.

CAPÍTULO 3

***Alternaria*: endofito de *Jatropha curcas* con potencial rol como bioinoculante fúngico, en el marco de una agricultura sustentable.**

Abreviaturas del capítulo 3

C1, C2, C3 y C4: Cepas de *Alternaria* aisladas a partir de hojas de *Jatropha curcas* en los ensayos del capítulo 1.

C5 y C6: Cepas de *Colletotrichum* aisladas a partir de hojas de *Blepharocalix salicifolia* en el trabajo de tesis del Dr. Esteban Español (2014).

Para diferenciar las inoculaciones artificiales de las naturales en lugar de la letra E se utilizó la letra I, aunque independientemente de su procedencia, ambas letras se refieren al estatus endofítico de las plantas:

I+: plantas inoculadas artificialmente con endofitos fúngicos.

I-: cepas no inoculadas, o libres de endofitos.

MG: inóculo de micorrizas de *Gigaspora rosea*, material donado por la Dra. Ivana Della Mónica

MJ: inóculo de hongos micorrícicos arbusculares nativos presentes en suelo rizosférico asociado a plantas de *Jatropha curcas*, utilizadas en los ensayos del capítulo, cuyo tratamiento fue E+N_s

LV: largo de vástago

LR: largo de raíz

PFR: peso fresco de raíz

PFV: peso fresco de vástago

PSR: peso seco de raíz

PSV: peso seco de vástago

PF: peso de frutos

NF: número de frutos

AA: medio de cultivo agar agua

AM: medio de cultivo agar malta

AAJ: medio de cultivo AA adicionado con hojas de *Jatropha curcas*.

AMJ: medio de cultivo AM adicionado con hojas de *Jatropha curcas*.

3.1 Introducción

El desarrollo de actividades agrícolas ha aumentado enormemente en las últimas décadas debido a la creciente demanda de productos para la alimentación y la producción de bienes de consumo por parte de la sociedad moderna. Esto ha generado la necesidad de aplicar métodos que permitan mejorar la eficiencia de los cultivos, proteger el suelo, reducir el uso de fertilizantes químicos y obtener más ganancias por área cultivada. Por eso, la agricultura sustentable ha sido un aspecto clave de las prácticas agrícolas a nivel mundial, buscando disminuir los efectos negativos que las actividades agrícolas más tradicionales tienen sobre el ambiente, aumentando los rendimientos de los cultivos y usando técnicas e insumos sostenibles y sustentables (Muñoz & Benavides, 2010). En este contexto, resulta de un alto interés encontrar organismos nativos que puedan ser aprovechados debido a sus potenciales usos como bioinsumos que puedan reemplazar el uso de productos químicos, nocivos para el medio ambiente y la salud humana, y así mitigar sus efectos negativos.

Los endófitos fúngicos tienen la capacidad de mejorar significativamente la salud y rendimiento de las plantas que los albergan, en comparación con aquellas que no están colonizadas. Este hecho ha generado un gran interés en la utilización de estos organismos como parte fundamental de estrategias integradas para el manejo y control de enfermedades (Ganley et al., 2008; Bailey et al., 2006; Raghavendra & Newcombe, 2012; Datta et al., 2022; Grabka et al., 2022). En relación a esto, se especula que la mayoría de los endofitos son beneficiosos para la planta hospedante a través de la síntesis de compuestos bioactivos (Owen & Hundley 2004). Dichos compuestos pueden ser utilizados por las plantas para la defensa contra patógenos, insectos, nematodos y animales herbívoros (Rodríguez et al. 2004). Además, los endofitos emplean una

variedad de mecanismos para facilitar el crecimiento de las plantas (Santoyo et al., 2015). Por ejemplo, algunos endofitos producen hormonas vegetales o pueden regular la expresión hormonal del hospedante, por lo tanto, pueden mejorar el crecimiento de las plantas y su tolerancia a los diferentes tipos de estrés (Hoffman et al., 2013; Rodríguez et al., 2004; Golparyan et al., 2018).

Alternaria es un género de Ascomycota presente en muchos ecosistemas, que agrupa especies que pueden ser saprobias, endófitas o patógenas para plantas o animales, incluidos los humanos (Wang et al., 2022). Se han descrito alrededor de 300 especies basadas en estudios filogenéticos y morfológicos, que se han dividido en 26 secciones (Lawrence et al., 2003; Woudenberg et al., 2015). Como un grupo destacado de patógenos fúngicos, las especies de *Alternaria* pueden causar enfermedades en una amplia gama de cultivos económicamente importantes (Thomma, 2003) lo que resulta en pérdidas económicas significativas, o efectos adversos sobre la salud humana y animal, como infecciones del tracto respiratorio superior y asma (Woudenberg et al., 2015; Zwickel et al., 2018).

Aunque se ha reconocido principalmente a las especies de *Alternaria* como patógenos, existen registros históricos que demuestran su presencia como endófitos en diferentes contextos. Uno de los primeros registros de *Alternaria* como endofito data de 1905, en un trabajo sobre micorrizas, donde se aisló este género de manera accidental (Gallaud, 1905). En un estudio sobre el agente causal de la enfermedad de pastos “ryegrass staggers”, se aisló accidentalmente una cepa de *Alternaria* como endofito (Neill, 1940). Spurr en 1975, estudiando la mancha foliar del tabaco, encontró que las cepas del género *Alternaria* eran las más abundantes en las plantas de *Nicotiana* spp. Además, los ensayos de patogenicidad realizados posteriormente confirmaron que estas cepas de *Alternaria* no

causaban la enfermedad en tabaco, por lo que fueron consideradas como endofíticas, y se comenzó a pensar que el género *Alternaria* no era estrictamente patógeno, como se creía.

Además del tabaco, hay registros de *Alternaria* como endofito en una variedad de plantas de cultivo, como fresa, manzana, colza, soja, arroz y cítricos (Gourley, 1969; Stewart et al., 2013; Zhang et al., 2014). En un estudio sobre las potenciales aplicaciones de los endofitos fúngicos en la tolerancia al estrés hídrico de las plantas, se describieron algunos de los beneficios que el género *Alternaria* aportaría, como por ejemplo un efecto antibacterial contra *Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* en plantas como *Bryophyllum pinnatum*, *Vitex negundo* y *Ricinus communis* (Deka et al., 2022).

Durante el desarrollo de esta tesis se demostró que cepas endofíticas nativas pertenecientes al género *Alternaria* fueron las más frecuentemente aisladas, a partir de las hojas de la planta *Jatropha curcas*, lo que permite hipotetizar que los efectos observados en el hospedante pueden ser, en gran parte, modulados o promovidos por todas o algunas de las cepas de *Alternaria* recuperadas como endofitos. Por esto sería de gran interés investigar si las cepas pertenecientes a este género son responsables directos de los efectos beneficiosos observados en las plantas estudiadas. Además, analizar las relaciones filogenéticas entre las cepas recuperadas permitirá caracterizar estos hongos y contribuir con el agregado de valor como potenciales herramientas en el marco de una agricultura sustentable. Este enfoque alternativo contribuirá a minimizar la necesidad de recurrir a agrotóxicos o prácticas agrícolas que pueden causar daño a los ecosistemas nativos.

3.2 Objetivo e hipótesis

La hipótesis de este trabajo es:

Las especies de endofitos foliares con mayor abundancia en Jatropha curcas serían las responsables de los efectos observados en relación a otros hospedantes.

Dado que las frecuencias de aislamiento para el género *Alternaria* fueron máximas en los tratamientos NsE+ (5.83) y sE+ (1.83) del capítulo 1 y en los tratamientos J+E+ (86.87) y J+E- (75,00) del capítulo 2, se propone entonces, como predicción, que las cepas del género *Alternaria* promoverán la micorrización de plantas artificialmente inoculadas.

El objetivo de este capítulo es:

Analizar si cepas seleccionadas de endofitos foliares de Jatropha curcas son responsables de las respuestas en el desarrollo y micorrización de otros hospedantes.

A fin de llevar adelante este objetivo se realizaron diferentes aproximaciones con los siguientes objetivos particulares:

- 1- Seleccionar cepas con aptitudes para su uso como bioinoculante.*
- 2- Establecer el efecto y la eficacia de la inoculación de las cepas seleccionadas de Alternaria en Cucumis sativus.*
- 3- Caracterizar mediante marcadores moleculares las cepas endofíticas seleccionadas.*

3.3 Materiales y métodos

Área de estudio

Todos los ensayos de este capítulo se realizaron en condiciones de laboratorio y en cámara de cultivo con fotoperiodo y temperatura controlada (24° C) del INMIBO –CONICET, en la ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Material vegetal

Para los ensayos se utilizaron semillas comerciales y plantas de *Cucumis sativus* L. (Golpak). Esta planta fue seleccionada debido a que es un cultivo de rápido crecimiento y fácil manipulación en condiciones de invernadero.

Para los ensayos de crecimiento de *Alternaria* se utilizaron hojas de plantas de *Jatropha curcas* L.

Selección de la/las cepas/s de *Alternaria* para su potencial uso como bioinoculante

Para realizar los siguientes ensayos, se utilizaron cepas de endofitos que fueron aisladas a partir de hojas de *Jatropha curcas* en los ensayos realizados en el capítulo 1. Los pasos de selección de la cepa que reúne las mejores condiciones para ser considerada como potencial bioinoculante se representan en la figura 3.1 y se detallan a continuación.

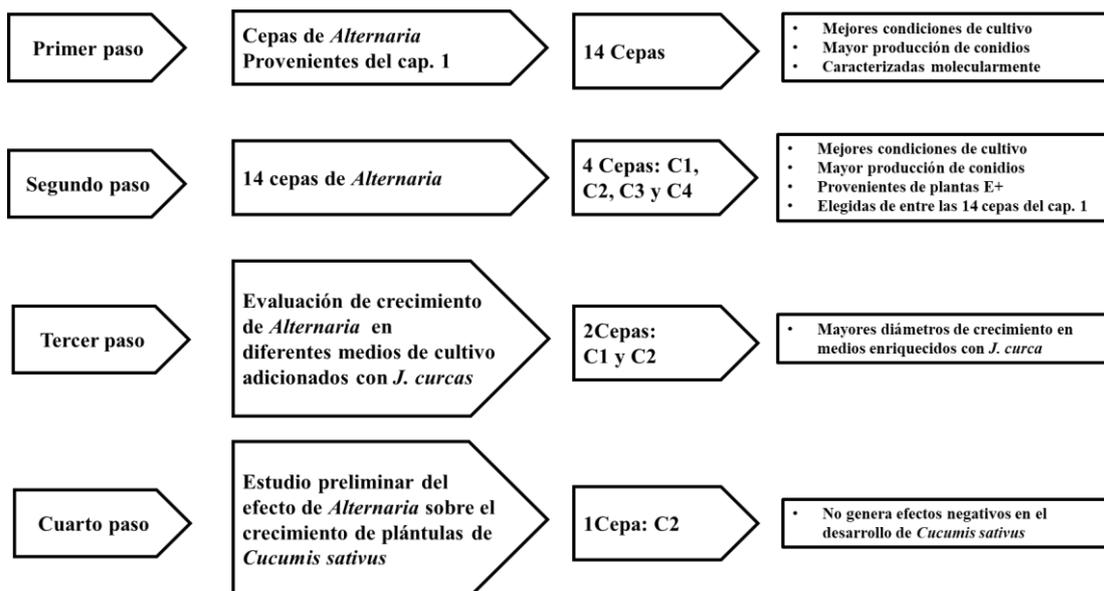


Figura 3.1: Esquema que resume los pasos de selección de la cepa que será utilizada para los ensayos de inoculación en *Cucumis sativus*.

Primer paso: 14 cepas de *Alternaria*



Como primer paso de selección de cepas, se seleccionaron 14 cepas nativas pertenecientes al género *Alternaria* aisladas a partir de los ensayos del capítulo 1. Estas 14 cepas fueron las que presentaron mayor producción de conidios y mejores condiciones de crecimiento en condiciones de cultivo.

Segundo paso: 4 cepas de *Alternaria*



Como segundo paso de selección, a partir de las 14 cepas de *Alternaria*, se seleccionaron 4 que pudieron ser recuperadas en sucesivos repiques, con las mismas características que las cepas originales. Dichas cepas de ahora en adelante serán denominadas C1, C2, C3 y C4.

Tercer paso: Evaluación del crecimiento de *Alternaria* en medios de cultivo adicionados con *J. curcas*.



Como tercer paso de selección, las 4 cepas de *Alternaria* (C1, C2, C3 y C4) se utilizaron en ensayos de crecimiento en diferentes medios de cultivo-, y se seleccionaron aquellas (C1 y C2) que presentaron mayores diámetros de crecimiento en medios adicionados con *Jatropha curcas* (ver resultados). El procedimiento se detalla a continuación.

Con el fin de caracterizar el crecimiento de *Alternaria* en relación a su hospedante se realizó el siguiente ensayo. Se cultivaron las 4 cepas seleccionadas de *Alternaria* (C1, C2, C3 y C4) y 2 cepas endofíticas pertenecientes al género *Colletotrichum*, en medios de cultivo enriquecidos o no con hojas de *Jatropha curcas*. Las 2 cepas de *Colletotrichum* (a partir de ahora C5 y C6) se eligieron como cepas control ya que las mismas fueron aisladas como cepas endofíticas nativas, a partir de *Blepharocalix salicifolia* (Español, 2014) en la misma área de estudio y durante la misma época del año en que se realizaron los ensayos a partir de los cuales se obtuvieron las cepas de *Alternaria*.

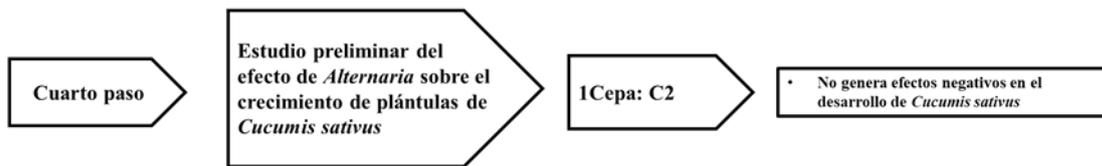
Para realizar los ensayos, las cuatro cepas de *Alternaria* y las dos de *Colletotrichum* se sembraron en placas de Petri conteniendo 2 medios diferentes: Agar Agua (AA) y Agar extracto de malta (AM) adicionados o no con hojas de *Jatropha curcas*: Agar agua con aditivo de *Jatropha curcas* (AAJ) y Agar extracto de malta con aditivo de *Jatropha curcas* (AMJ).

Para los medios adicionados con hojas de *Jatropha curcas*, estas previamente se esterilizaron superficialmente, y se colocaron en las placas en el momento en el que se distribuyeron los medios de cultivo sobre estas. En todos los casos se utilizó cloranfenicol (SIGMA ALDRICH) como antibiótico para prevenir el crecimiento de bacterias.

El ensayo contó con un diseño experimental conformado por 2 factores con 2 niveles cada uno: medio de cultivo (AA, AM), y aditivo (J y J-), realizándose 5 réplicas para cada nivel. Se evaluó el crecimiento de las 6 cepas endofíticas en los diferentes medios.

Las placas inoculadas con los hongos, se incubaron en cámara de cultivo a 24°C y se midió periódicamente el crecimiento radial de las colonias (se utilizaron placas de 90 mm de diámetro). Transcurridos 6 días post siembra (tiempo en el cual la primera colonia llegó a los bordes de la placa de Petri) se registraron los diámetros y se procedió al análisis de los datos.

Cuarto paso: Estudio preliminar del efecto de *Alternaria* sobre el crecimiento de plántulas de *Cucumis sativus* L



Como cuarto paso, las cepas seleccionadas (C1 y C2) se utilizaron en estudios preliminares de crecimiento de *Cucumis sativus* con exudados de las 4 cepas seleccionadas. Se seleccionó aquella que no presentó efectos negativos sobre el desarrollo de *Cucumis sativus*. El procedimiento se detalla a continuación.

Con el objetivo de evaluar los potenciales efectos negativos de los exudados de las cuatro cepas endofíticas de *Alternaria* previamente seleccionadas, se realizaron ensayos cualitativos de sensibilidad utilizando plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) como bioindicador por su sensibilidad a las toxinas producidas por miembros de *Alternaria* (Halloin et al., 1960). Para llevar a cabo estos ensayos, las semillas de pepino se germinaron en presencia o ausencia de los exudados obtenidos a partir de cultivos puros de *Alternaria*. Para obtener dichos exudados, las cepas se incubaron durante un mes en frascos Erlenmeyer conteniendo medio V8 líquido en oscuridad y de manera estática a 24°C. Transcurrido dicho periodo, se filtró el contenido de los frascos, en esterilidad, descartándose el micelio del hongo y recuperando el sobrenadante. Una vez obtenido los filtrados de dichas cepas, se realizaron diluciones que fueron utilizadas en el siguiente ensayo.

El diseño experimental contó con 2 factores: la/las cepas/s endofítica y 2 diluciones (exudado puro y dilución 1:10 del exudado). Se hicieron germinar 250 semillas de pepino en placas de Petri con papel absorbente estéril, distribuidas de a 10 semillas por placa (previo lavado con agua estéril) en oscuridad por 48 hs. Cada tratamiento (cepa x

dilución) contó con 5 réplicas, y 5 réplicas correspondientes al control, donde se utilizó agua estéril. Cada placa fue asignada al azar a alguno de los tratamientos, donde cada placa fue regada con una de las diluciones obtenida de las cepas o se asignó al control. Las placas, con las semillas y los tratamientos, se mantuvieron en oscuridad por 48 hs a 24°C y luego expuestas a la luz. Cuando las plántulas alcanzaron el tamaño adecuado, se midieron tres indicadores de sensibilidad: longitud de las raíces (LR), severidad (S) e incidencia (I).

La severidad en las plántulas se determinó como el porcentaje de la superficie de las plántulas que mostraba síntomas de clorosis. Este parámetro refleja de manera precisa la relación entre la enfermedad y el daño que causa al cultivo (Ivancovich, et al., 1998). La severidad se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Severidad (S)} = (\text{superficie de tejido enfermo} / \text{superficie total (sano + enfermo)}) * 100$$

Además, se evaluó la incidencia, que representa el porcentaje de plantas enfermas en relación al total (Ivancovich, et al., 1998). Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la incidencia:

$$\text{Incidencia (I)} = (\text{número de plantas enfermas} / \text{número total de plantas}) * 100$$

Preparación del inóculo

Para la obtención de inóculo a partir de las cepas seleccionadas, se procedió de la siguiente manera: se realizaron cultivos de la cepa en placas de Petri conteniendo AA (experimentalmente se comprobó que este medio promueve la conidiación del hongo, y

facilita la cosecha de los conidios). Los cultivos fueron monitoreados diariamente, y una vez que se detectó la presencia de conidios, se procedió a cosecharlos utilizando un rastrillo de Drigalsky previamente esterilizado. Se realizó una suspensión de 10^6 conidios/ml en agua destilada estéril con tween 80 (0.1% v/v; Difco™). Dado que los conidios de *Alternaria* suelen germinar en el transcurso de 24 h la inoculación se realizó según Estrada *et al.* (2013), el mismo día de la preparación del inóculo.

Selección del método de inoculación

Con las cepas (C1 y C2) cuyos exudados no generaron ningún impacto negativo en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de pepino (ver **Estudio preliminar del efecto de *Alternaria* sobre el crecimiento de plántulas de *Cucumis sativus* L.**) se llevaron a cabo distintos ensayos en plantas de *C. sativus* para evaluar la eficacia de diferentes métodos de inoculación, según se describe a continuación. Se hicieron germinar semillas de pepino en vasos descartables conteniendo un sustrato 1:1:1 (suelo: perlita: vermiculita) previamente esterilizado por tindalización (una hora en autoclave con espita abierta durante tres días consecutivos). Se seleccionaron 10 plantas para cada ensayo y se probaron tres procedimientos de inoculación diferentes. Dos de ellos, fueron utilizados por Kusari *et al.* (2011), y el tercero por Estrada (2014). Se esquematizan en la Figura 3.2 y consisten en:

a) Apoyar directamente sobre la superficie de las hojas esterilizadas superficialmente, pequeños bloques obtenidos del borde en activo crecimiento (de colonias de 10 días de cultivo) en medio agarizado (Kusari *et al.*, 2011).

b) Similar que el ítem a), con la diferencia que, una vez aplicado el pequeño bloque, se realiza una puntuación con una aguja estéril (para provocar una ruptura de hoja y facilitar

la entrada del hongo). En ambos casos, la hoja inoculada fue cubierta con Parafilm a fin de mantener la humedad (Kusari et al., 2011).

c) El tercer método puesto a prueba consiste en la inoculación de una suspensión de conidios (10^6 - 10^7 conidios/ml) por el método de aspersión, y luego las plantas inoculadas son mantenidas en un ambiente con alta humedad durante al menos 15 hs, para facilitar la colonización fúngica (Estrada et al., 2013).

Luego de un periodo de 2,5 semanas, se realizaron aislamientos a partir de hojas de pepino inoculadas con los diferentes métodos (1 hoja por planta, 6 fragmentos por hoja), y se determinó el método de inoculación más eficiente a partir del porcentaje de aislamiento de las cepas de *Alternaria* recuperadas en cada método según la siguiente fórmula:

$$\%EI = (\text{Aislamientos endofíticos totales} / \text{total de fragmentos analizados por hoja}) * 100$$

Se seleccionó el método mediante el cual se obtuvo un mayor mayor %EI.

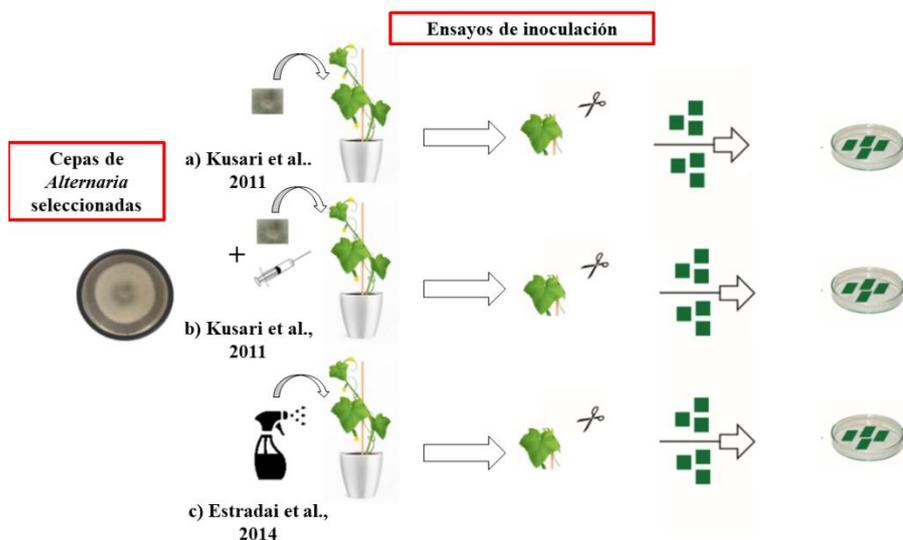


Figura 3.2: Esquema de los tres métodos de inoculación puestos a prueba sobre plántulas de *Cucumis sativus*: a) y b) Kusari et al., 2011 y c) Estrada et al., 2013.

Evaluación de cepas *Alternaria* como agente de promoción de la micorrización y desarrollo vegetal en *Cucumis sativus*.

Establecimiento de los tratamientos

Una vez seleccionado el método más eficaz de inoculación, se procedió a establecer los tratamientos, con el fin de evaluar el potencial uso de la cepa de *Alternaria* seleccionada como bioinoculante (C2) y potencial promotora de la micorrización de raíces en *C. sativus*. Para ello se hicieron germinar semillas de pepino en vasos descartables con un sustrato apropiado igual al descrito anteriormente (Suelo:perlita:vermiculita en proporción 1:1:1 previamente tinalizado). Luego se sembraron 3 semillas por vaso distribuidas en 100 vasos. De las plántulas crecidas por vaso, se seleccionó la más vigorosa, descartándose las otras dos, obteniendo de esta manera una plántula por vaso.

Las 54 plántulas obtenidas en total, se distribuyeron al azar en macetas de 0.8 litros (conteniendo el mismo tipo de sustrato estéril) y se mantuvieron en cámara de cultivo (con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y a temperatura de 25°C) durante 8,5 semanas. Luego de transcurrido ese tiempo, 27 plantas se inocularon con la cepa seleccionada y por el método que resultó más efectivo (I+), y 27 plantas se cultivaron en idénticas condiciones, pero sin ser inoculadas (I-) como control. Luego se realizaron aislamientos de endofitos a partir de hojas de las plántulas de pepino y se calculó la frecuencia de cepas de *Alternaria* para corroborar el éxito de la inoculación.

Análisis de la eficacia de la infección endofítica

Con el fin de asegurar que los endofitos recuperados, luego de los ensayos de inoculación, pertenecieran a la cepa originalmente inoculada, transcurridas 2.5 semanas se procedió al aislamiento e identificación de estos. Para ello se procedió de la misma manera que en los capítulos 1 y 2. De cada una de las 27 plantas pertenecientes a cada tratamiento (I+ o I-) se tomaron dos hojas al azar, y se cortaron 4 fragmentos de cada una, con sacabocado estéril. En total se analizaron 432 fragmentos. Dichos fragmentos se sembraron en placas de Petri conteniendo MEAch. Las placas se mantuvieron en cámara de cultivo a 24°C promedio, y se revisaron periódicamente. Cuando se detectó la presencia de micelio a partir de los fragmentos, los mismos se recuperaron y se sembraron en placas de Petri de 60 mm con el mismo medio, y se mantuvieron en las mismas condiciones. Luego se procedió al análisis microscópico de los cultivos, para realizar su identificación morfológica. En este caso también se determinó el porcentaje de aislamiento de las cepas de *Alternaria* recuperadas según la siguiente fórmula:

$$\%EI = (\text{Aislamientos endofíticos totales} / \text{total de fragmentos analizados por hoja}) * 100$$

Adicionalmente se realizaron análisis moleculares de las cepas recuperadas.

Análisis de micorrización en *Cucumis sativus* L.

Para establecer el efecto de la cepa de *Alternaria* seleccionada e inoculada según Estrada et al. (2013) sobre la micorrización en *C. sativus* se llevó adelante un ensayo cuyo diseño experimental contó con 2 factores fijos: estatus endofítico (I+/I-) y estatus micorrícicos (*Gigaspora rosea*, inóculo nativo, sin inoculación), de esta manera se establecieron 6 tratamientos.

El factor micorrización contó con 3 niveles: inoculación con *Gigaspora rosea* (MG) (inóculo cedido por la Dra. Ivana Della Mónica), inoculación con suelo proveniente de los ensayos de acondicionamiento de macetas con *Jatropha curcas* del capítulo 2 de este trabajo, el cual contenía suelo con inóculo nativo (MJ), y plantas sin inocular (M-). Las 27 plantas ya acondicionadas como I+ o I- fueron distribuidas al azar entre los 3 niveles del estatus micorrícicos, por lo que se contó con N=9 dentro de cada tratamiento. Para la inoculación de HMA, 2 g de sustrato (suelo: perlita: vermiculita en proporción 1:1:1) conteniendo esporas de *G. rosea* o HMA nativos fueron incorporados en las macetas en un hueco realizado a 2 cm de la superficie en contacto con la raíz de las plantas.

Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo (con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y a temperatura de 25°C) durante 2 meses. Luego de transcurrido ese tiempo, se separaron partes de raíz de cada planta, las cuales se procesaron según (Phillips & Hayman, 1970) al igual que en los capítulos 1 y 2, y se contabilizaron las estructuras micorrícicas presentes en las raíces (arbúsculos, hifas, coils y vesículas), según McGonigle (1990).

Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento vegetal de *Cucumis sativus* L.

Al momento de la cosecha se registraron los siguientes parámetros: el largo de vástago (LV) y raíz (LR), peso fresco de las raíces (PFR) y de los vástagos (PFV) y se registró la cantidad (NF) y el peso de los frutos (PF). El peso seco se obtuvo manteniendo las muestras en estufa a 60°C hasta alcanzar peso constante.

Análisis moleculares y filogenéticos

Caracterización molecular

La identificación por caracteres moleculares de las cepas seleccionadas se realizó como se describe a continuación. Se extrajo DNA genómico de las 4 cepas (C1, C2, C3 y C4) obtenidas en el capítulo 1 a partir de hojas de *Jatropha curcas*, y de 4 cepas recuperadas a partir de hojas de *Cucumis sativus* (C2 i, C2 ii, C2 iii y C2 viii), luego de los ensayos de inoculación. Se utilizó el Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Solana Beach, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La región ITS (internal transcribed spacer) de dichas cepas se amplificó utilizando los primers universales ITS1 e ITS4, bajo las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización a 94°C por 3 min., 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg., renaturalización a 57°C por 45 seg., extensión a 72°C por 1 min. y extensión final a 72°C por 7 min. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 50 µl conteniendo solución buffer para PCR 10 mM, suministrada por el fabricante, 50 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 10 mM de cada primer, 1 U de ADN recombinante Taq polimerasa (Invitrogen, Brazil) y 3 µl de ADN genómico fúngico. La purificación del producto de PCR y la secuenciación de los fragmentos se lleva a cabo por Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

Análisis filogenético

Se realizó la reconstrucción filogenética utilizando las 4 secuencias de las cepas de *Alternaria* aisladas en el capítulo 1, junto con las 4 secuencias obtenidas posteriormente a los ensayos de establecimiento de los tratamientos (ensayos de inoculación) en plantas de pepino. Adicionalmente, se incluyó el mismo conjunto de datos obtenidos del Blast que se utilizó en el capítulo 1. Se realizó un alineamiento utilizando el software BioEdit v.7.0.5.3 Hall (1999). Los costos asignados fueron 15 por *gap openings* y 6 por *gap extensions*. Los datos se analizaron utilizando NONA v.2.0 (Goloboff 1997) por el método de MP. A todos los caracteres se les dio el mismo peso, y los gaps se consideraron como datos faltantes. Se utilizaron 2000 repeticiones y un máximo de 10000 árboles. Para determinar el soporte de cada clado, se realizaron análisis de *bootstrap* con 1000 repeticiones (**Anexo estadístico y filogenético del capítulo 3**).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de ensayos de crecimiento de *Alternaria* en diferentes medios de cultivo, se realizó un ANOVA de 2 factores ($p < 0.05$) donde los factores principales fueron: medio de cultivo (AA o AM) y aditivo (AMJ o AAJ). Todos los supuestos fueron chequeados.

Las variables continuas (largo, peso) se analizaron utilizando ANOVA de 2 factores ($p < 0.05$), mientras que las variables discretas (micorrización de raíz (MG, MJ), así como para el recuento de frutos (NF)), se usaron modelos lineales generalizados basados en una distribución de Poisson. En los casos donde no se cumplió el supuesto de dispersión (Bates & Neyman, 1952), se probaron diferentes modelos basados en la distribución Binomial Negativa, y se seleccionó el modelo de mejor ajuste.

3.4 Resultados

Selección de la/s cepa/s para su uso como bioinoculante

Luego de los primeros pasos de selección de cepas, basados en parámetros cualitativos (pasos 1 y 2), se procedió a la selección de la cepa que luego será utilizada en ensayos de inoculación y micorrización según los pasos 3 y 4 cuyos resultados se detallan a continuación.

Paso 3: Evaluación del crecimiento de *Alternaria* en medios de cultivo adicionados con *J curcas*.

Los resultados obtenidos a partir del estudio del crecimiento de *Alternaria* en diferentes medios de cultivos, usando como control una cepa endofítica correspondiente a *Colletotrichum*, se muestran en la figura 3.3.

Los resultados mostraron que los mayores diámetros de crecimiento de las colonias de *Alternaria* para las cepas C1, C2, y C4, se dan en medios enriquecidos con *Jatropha curcas* (AAJ y AMJ) con respecto a los medios no enriquecidos con la planta (AA y AM). El análisis estadístico para C1 (*Alternaria*) reveló que existen diferencias significativas debido a la adición de hojas de *Jatropha curcas* al medio de cultivo ($F_A=36.817$, $p_A < 0.05$) pero no debido al medio de cultivo ($F_M=2.07$, $p_M= 0.175$) ni a la interacción de los factores ($F_{MxA}=0.47$, $p_{MxA}=0.53$). Asimismo, C2 (*Alternaria*) presentó diferencias significativas debido a la adición de hojas de *Jatropha curcas* al medio de cultivo ($F_A=89.11$, $p_A < 0.05$) y a la interacción de los factores (medio x aditivo) con el tipo de medio ($F_{MxA}=13.93$, $p_{MxA} < 0.05$) pero no debido al medio de cultivo ($F_M= 0.001$, $p_M=1$). En el caso de C3 (*Alternaria*) se observaron diferencias significativas debido a los

diferentes medios de cultivo ($F_M=10.49$, $p_M<0.05$), y a la interacción con el tipo de aditivo ($F_{MxA}=16.559$, $p_{MxA}<0.05$), pero no debido a la adición de *Jatropha curcas* al medio ($F_A=2$, $p_A=0.2$). Esta cepa presentó un mayor crecimiento cuando la única fuente de nutrientes provino de las hojas de *Jatropha curcas* (AAJ) pero cuando existía otra fuente de carbono (AM), la cepa C3 creció mejor sin el agregado de *Jatropha curcas* (AMJ). La cepa C4 (*Alternaria*) presentó diferencias significativas debido al medio de cultivo ($F_M=7.1$, $p_M=0.01$) y al aditivo de *Jatropha curcas* ($F_A=19$, $p_A<0.05$) pero no debido a la interacción de los factores ($F_{MxA}=2$, $p_{MxA}=0.2$).

Por el contrario, las cepas C5 y C6 (*Colletotrichum*) presentaron mejor crecimiento cuando el medio de cultivo posee más fuentes de carbono (AM y AMJ) frente a los medios menos nutritivos (AA y AJ). La cepa C5 presentó diferencias significativas debido a los diferentes medios de cultivo ($F_M=138.663$, $p_M<0.05$), a la adición de *Jatropha curcas* ($F_A=22.785$, $p_A<0.05$ y $F_{A35.310}$, $p_A<0.05$ para C5 y C6 respectivamente) y a la interacción de los factores ($F_{MxA}=5$, $p_{MxA}=0.04$). En el caso de C6, se observaron diferencias significativas debido al medio del cultivo ($F_M=108.138$, $p_M<0.05$) y a la interacción con los factores ($F_{MxA}=35$, $p_{MxA}<0.05$), pero no debido al aditivo con *Jatropha curcas* ($F_A=3.4$, $p_A=0.1$).

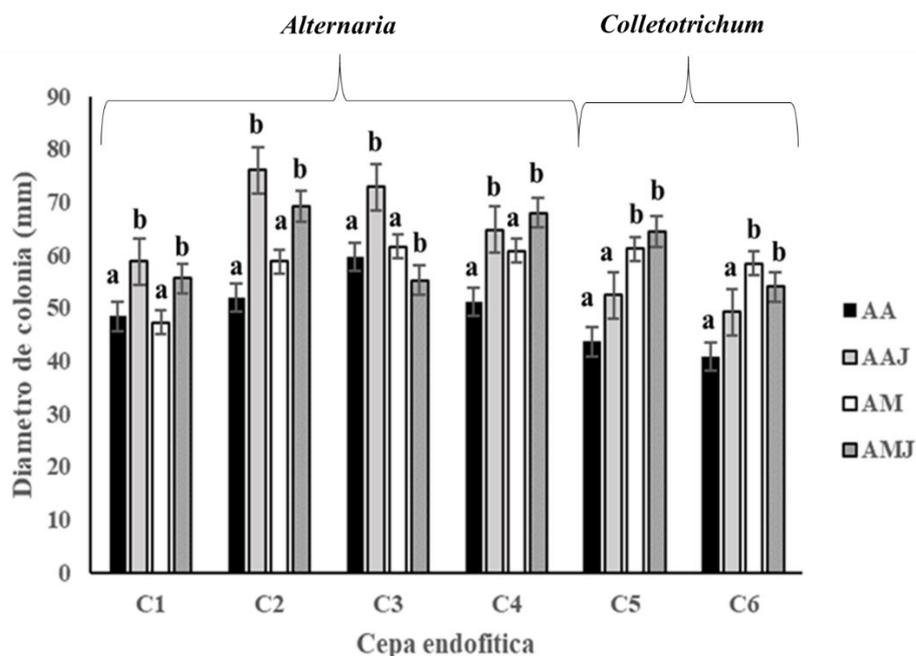


Figura 3.3: Diámetro de las colonias de *Alternaria* (C1, C2, C3 y C4) y *Colletotrichum* (C5 y C6) luego de 6 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Diferentes letras denotan la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$).

Paso 4: Estudio preliminar del efecto de *Alternaria* sobre el crecimiento de plántulas de *Cucumis sativus* L.

Luego de evaluar el comportamiento de las cepas en diferentes medios de cultivo, se seleccionaron 2 de las que presentaron mejores condiciones de crecimiento frente a medios de cultivo enriquecidos con *Jatropha curcas*. Dichas cepas fueron C1 y C2, y las mismas se utilizaron en los ensayos de evaluación del efecto de *Alternaria* sobre el crecimiento de *C. sativus*, cuyos resultados se describen a continuación.

El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos para la variable LR (largo de raíz) ($F=1.277$, $p= 0.29$). Sin embargo, se observó que las semillas que fueron regadas con una solución 1:1 y 1:10 del exudado de

la cepa C2, presentaron los valores más altos de LR, con respecto a aquellas plántulas que fueron regadas con los exudados de C1 y con respecto al control con agua. A su vez, la cepa C2 presentó un 0% de semillas cloróticas.

Tabla 3.1: Indicadores de sensibilidad medidos sobre semillas de *Cucumis sativus* crecidas con diferentes soluciones: Agua estéril, diluciones 1:1 y 1:10 de C1 y C2 (obtenidas a partir de exudados presentes en el medio de cultivo donde crecieron las cepas de A). Indicadores del efecto: largo de raíz (cm), semillas cloróticas (%), Severidad (%) e Incidencia (%).

Tratamiento	Indicadores de sensibilidad			
	Largo de raíz (cm)	Semillas cloróticas (%)	Severidad (%)	Incidencia (%)
Agua	2.20	0.00	0.00	0.00
Sn madre C1	0.50	10.00	2.00	100.00
Sn 1/10 C1	1.50	10.00	2.00	100.00
Sn madre C2	2.70	0.00	0.00	0.00
Sn 1/10 C2	5.60	0.00	0.00	0.00

Selección del método de inoculación

Los resultados obtenidos a partir del uso de los diferentes métodos de inoculación se presentan en la Tabla 3.2. El método de Estrada et al (2013) descrito bajo el ítem c) en materiales y métodos fue el más eficiente con un 12% y un 20% de infecciones exitosas de *Alternaria* para las cepas C1 y C2 respectivamente.

Tabla 3.2: Resultados del porcentaje de recuperación de cepas de *Alternaria* inoculadas en plantas de *Cucumis sativus* (%EI= (Aislamientos endofíticos totales/ total de fragmentos analizados por hoja) * 100) inoculadas con tres métodos diferentes: Kusari et al (2011) a) y b), y Estrada et al. (2013) c).

Método de Inoculación	% de infección de <i>Alternaria</i>	
	C1	C2
Kusari et al. (2011) a)	0	0
Kusari et al. (2011) b)	1	2
Estrada et al. (2013) c)	12	20

Evaluación de cepas *Alternaria* como agente de promoción de la micorrización y desarrollo vegetal en *Cucumis sativus*.

Luego de los diferentes análisis sobre las cepas de *Alternaria*, se consideró que la cepa C2 es la que reúne las mejores condiciones para ser utilizada en los ensayos de inoculación, y el método de Estrada et al. (2013) fue considerado el más eficiente. Los resultados se describen a continuación.

Análisis de la eficacia de la infección endofítica

Los resultados de la inoculación con la cepa de *Alternaria* (C2) en plantas de pepino (*C. sativus*) indicaron que, de los 432 fragmentos analizados en total (216 fragmentos por cada ensayo), se obtuvo una frecuencia de aislamiento del 14.81%. Todos los aislamientos recuperados (100%) pertenecieron al género *Alternaria*. En contraste, en las plantas no inoculadas, se encontró una frecuencia de aislamiento del 1.85%, y ninguno de los aislamientos correspondió al género *Alternaria*. Los resultados se presentan en la tabla 3.3

Tabla 3.3: Infección endofítica a partir de la inoculación de plantas de *C. sativus* (I+) con una suspensión de conidios de *Alternaria* (C2), según el método descrito por Estrada et al. (2013). El tratamiento I- corresponde al control de plantas sin inocular. El % de *Alternaria* se calculó según la fórmula %EI= (Aislamientos endofíticos totales/ total de fragmentos analizados por hoja) * 100

	Tratamiento	
	I+	I-
<i>Total fragmentos</i>	216	216
<i>Total aislamientos</i>	32	4
<i>Total Alternaria</i>	32	0
<i>% aislamientos totales</i>	14.81	1.85
<i>%Alternaria</i>	100	0

Análisis de micorrización en *Cucumis sativus* L.

Los resultados obtenidos en el estudio de los efectos de la inoculación de la cepa seleccionada de *Alternaria* sobre el recuento de HMA totales y de las diferentes estructuras micorrícicas (arbúsculos y vesículas) evaluadas a partir de raíces de pepino (Tabla 3.3) se presentan en la figura 3.4 y se detallan a continuación. Los tratamientos que no incluyeron inoculación de micorrizas (I+M- y I-M-) no fueron tenidos en cuenta en este análisis:

Tabla 3.3: Tipo de inóculo utilizado en cada tratamiento para el análisis de micorrización de *Cucumis sativus*: I+MG: plantas inoculadas con *Alternaria* y *G. rosea*; I+MJ: plantas inoculadas con *Alternaria* y HM nativos; I-MG: plantas no inoculadas con *Alternaria*, pero sí con *G. rosea*; y I-MJ: plantas no inoculadas con *Alternaria*, pero sí con HM nativos.

Tratamiento	Inóculo utilizado	
	Endofito	Micorriza
I+MG	C2	<i>Gigaspora rosea</i>
I+MJ	C2	HM nativos
I+M-	C2	-
I-MG	-	<i>Gigaspora rosea</i>
I-MJ	-	HM nativos
I-M-	-	-

El análisis de los resultados obtenidos para el recuento de HMA totales, arbusculos y vesículas reveló que existen diferencias significativas ($Lr= 23.38$, $\chi^2 < 0.05$; $Lr=19.44$, $\chi^2 < 0.05$ y $Lr= 35.68$ $\chi^2 < 0.05$ respectivamente) debido a la asociación con endofitos *Alternaria* (I+) (Fig. 3.4).

No se observaron recuento de coils para ninguno de los tratamientos, por lo tanto, esta variable no fue incluida en los análisis.

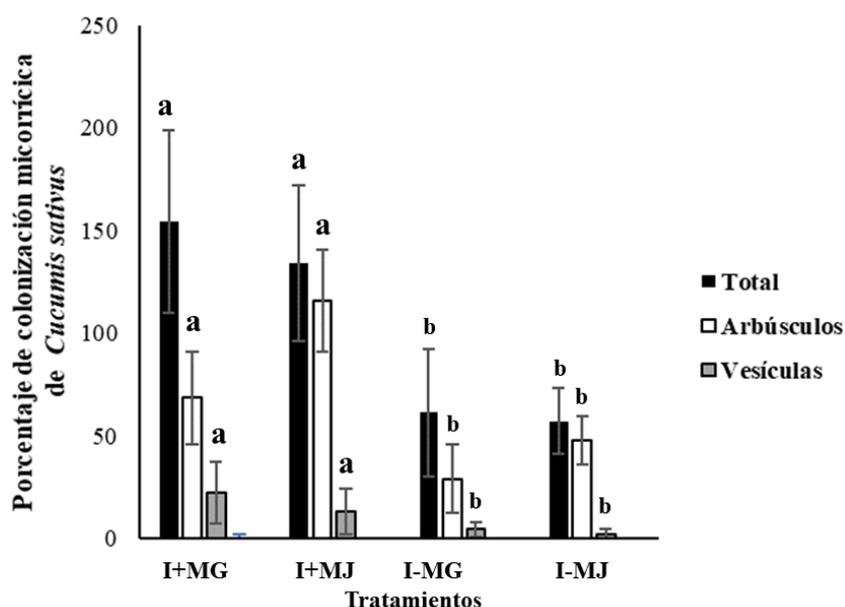


Figura 3.4: Porcentaje de colonización micorrícica para plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos: I+MG (plantas inoculadas con la cepa de *Alternaria* C2 y *G. rosea*), I+MJ (plantas inoculadas con la cepa de *Alternaria* C2 y HMA nativos), I-MG y I-MJ (plantas inoculadas con los mismos HMA, pero sin inoculación con endofitos). Letras diferentes denotan la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$)

Análisis de biomasa y parámetros de crecimiento de *Cucumis sativus* L.

Los resultados del análisis de biomasa y los parámetros de crecimiento de *Cucumis sativus* (PFV: peso fresco de vástago, PSV: peso seco de vástago, LV: largo de vástago,

PFR: peso fresco de raíz, PSR: peso seco de raíz, PF: peso de frutos y NF: número de frutos) obtenidos a partir de los ensayos de inoculación de *Alternaria* (C2) y HMA (como se describen en la tabla 3.4) se muestran en la figura 3.5 y los resultados se detallan a continuación:

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para PFV ($F_I=0.004$, $p_I=0.900$; $F_{HM}=0.9$, $p_{HM}=0.4$; $F_{IxHM}=1.96$, $p_{IxHM}=0.15$), PSV ($F_I=0.80$, $p_I=0.40$; $F_{HM}=3.12$, $p_{HM}=0.10$; $F_{IxHM}=0.7$, $p_{IxHM}=0.5$) y LV ($F_I=2.34$, $p_I=0.13$; $F_{HM}=0.25$, $p_{HM}=0.77$; $F_{IxHM}=0.36$, $p_{IxHM}=0.70$). Los resultados se muestran en las figuras 3.5, 3.6 y 3.7.

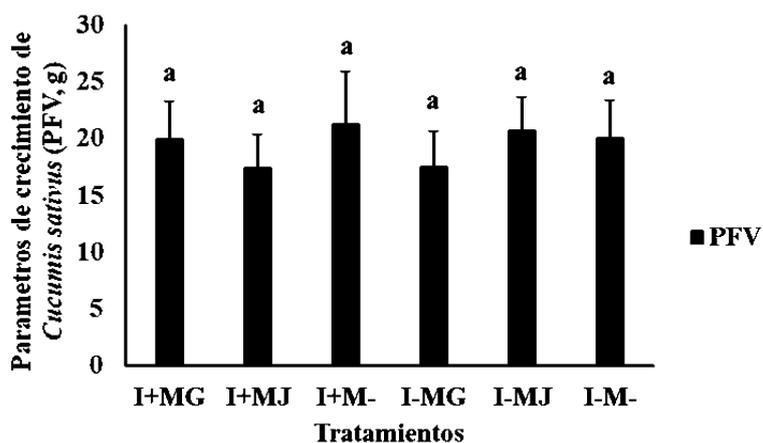


Figura 3.5: Peso fresco de vástago (PFV) expresados en g de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA ($p < 0.05$).

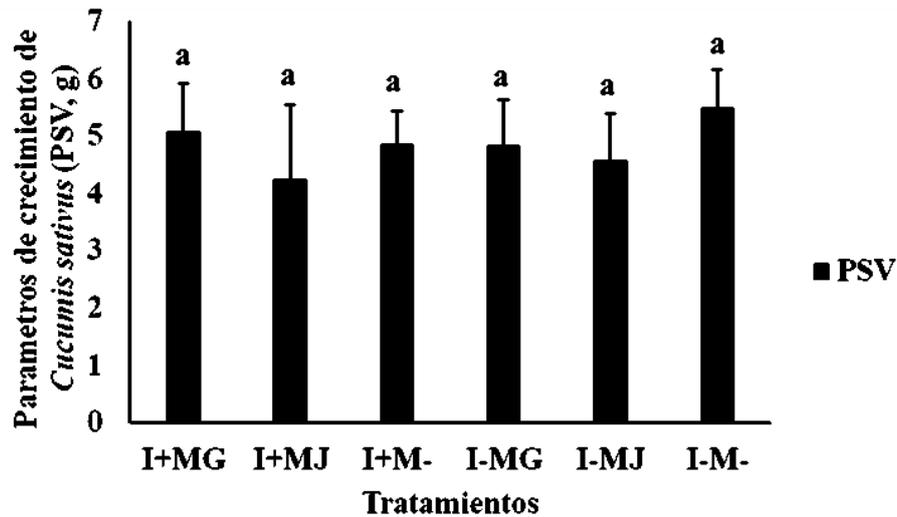


Figura 3.6: Peso seco de vástago (PSV) expresados en g de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA ($p < 0.05$).

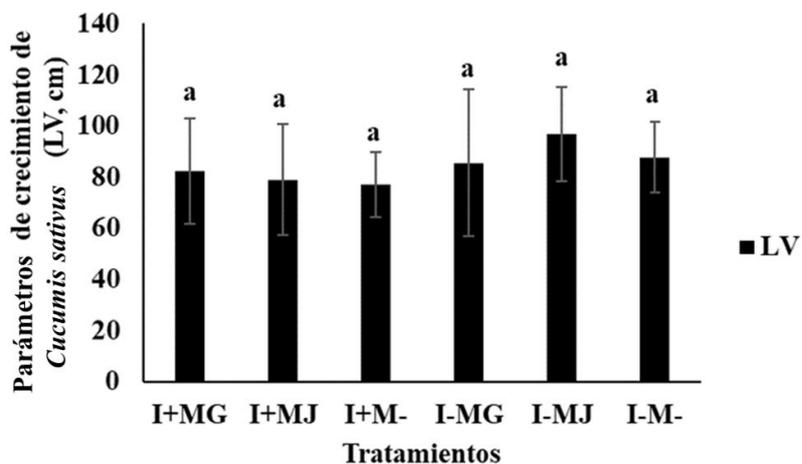


Figura 3.6: Largo de vástago (LV) de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para el peso fresco de raíces (PFR) presentaron diferencias significativas debido a la inoculación con *Alternaria* ($F_{17.52}$, $p < 0.05$) y con HMA

($F_{HM}=5.24$, $p_{HM}< 0.05$) pero no debido a la interacción ($F_{IxHM}=0.84$, $p_{IxHM}=0.44$). Se observa que los valores de PFR de plantas de *C. sativus* I+ M- son significativamente mayores a los valores de PFR de plantas I+MJ, I-MG, I- e I-M- (Fig. 3.7).

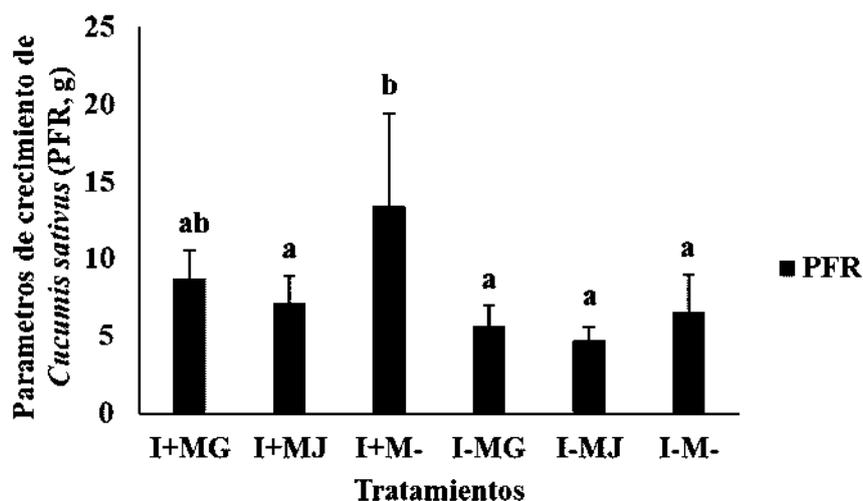


Figura 3.7: Pesos fresco de raíz (PFR) de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA ($p<0.05$).

Al analizar los resultados obtenidos para la variable PSR, se evidencian 3 grupos: en un extremo, con los valores más altos de PSR, se encuentra el tratamiento I+M- y en el otro extremo, con los valores menores de PSR, se encuentra el tratamiento I-MJ. En el medio se encuentran el resto de los tratamientos, con valores intermedios. Las diferencias significativas observadas se deben a la inoculación con *Alternaria* ($F= 5.18$, $p< 0.05$), pero no debido a la inoculación con HMA. Los resultados se presentan en la figura 3.8.

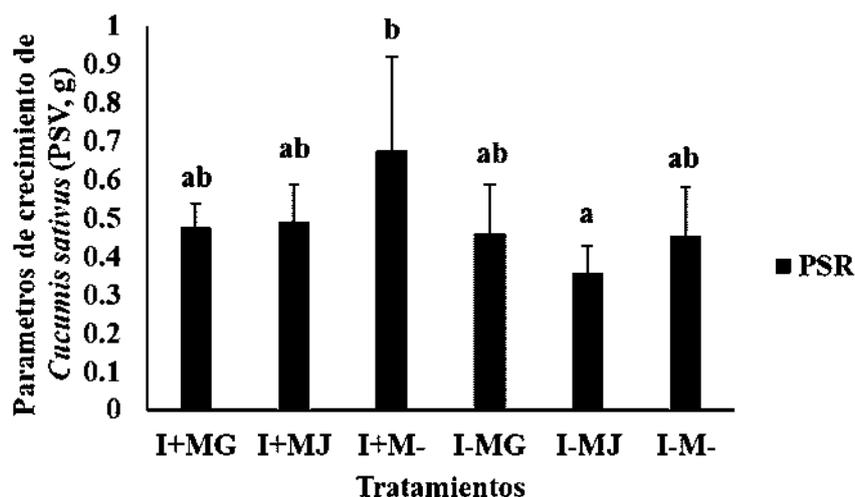


Figura 3.8: Peso seco de raíz (PSR) de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para PF mostraron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Cabe aclarar que debido a la sobre dispersión de los datos fue necesario retirar varios valores considerados outliers. Los resultados se muestran en la figura 3.9.

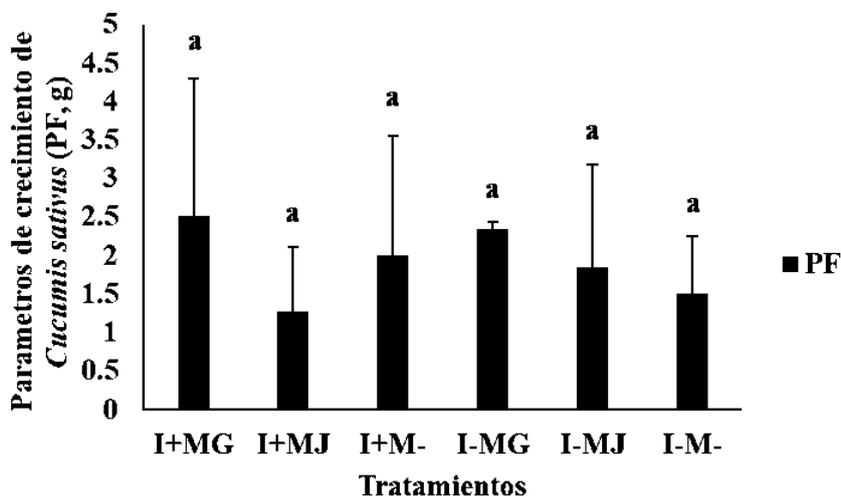


Figura 3.9: Peso de fruto (PF) de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA ($p < 0.05$).

En el caso del análisis del número de frutos (NF) los resultados indicaron que existen diferencias significativas debido a la colonización con endofitos ($L_I=13.88$, $p_I<0.005$), donde se observó que las plantas con mayor número de frutos son aquellas pertenecientes al tratamiento I+MG, y las plantas con menor cantidad de frutos pertenecieron al tratamiento I-MG (Fig. 3. 10).

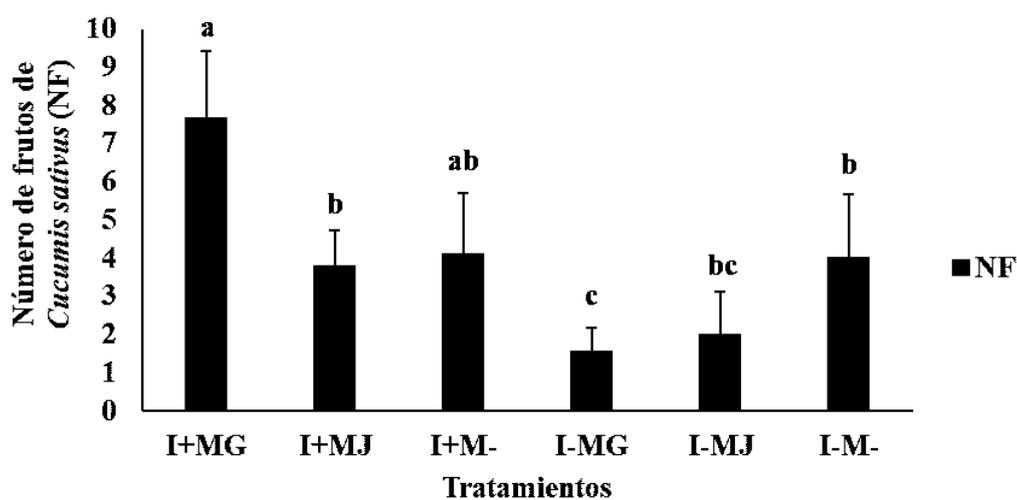


Figura 3.10: Numero de frutos (PSR) de plantas de *C. sativus* sometidas a diferentes tratamientos. I+, plantas inoculadas con la cepa C2; I-, plantas no inoculadas; MG suelos inoculados con *Gigaspora rosea*; MJ, suelos inoculados con micorrizas nativas y M-, suelos no inoculados con HM. Letras diferentes muestran diferencias significativas. GLM binomial negativa ($p<0.05$).

Análisis moleculares y filogenéticos

Los análisis moleculares y filogenéticos corroboraron la ubicación de las cepas utilizadas (C1, C2 C3 y C4) y las cepas recuperadas (C2 i, C2 ii, C2 iii y C2 viii) luego de los ensayos de inoculación de *C. sativus* con la cepa C2, en el género *Alternaria*. El árbol filogenético, así como las secuencias utilizadas para el análisis se encuentran en la sección

Anexo estadístico y filogenético del capítulo 3

3.5. Discusión

El objetivo de este capítulo fue analizar si cepas seleccionadas de endofitos foliares de *Jatropha curcas*, son las responsables de las respuestas en el desarrollo vegetal y micorrización de otros hospedantes, y determinar si estos organismos pueden ser utilizados como bioinoculantes fúngicos, en el marco de una agricultura sustentable. Para ello seleccionamos 14 cepas del género *Alternaria*, ya que este fue el género que presentó mayor abundancia en todos los ensayos de aislamiento realizados en este trabajo, a partir de hojas de *Jatropha curcas*, y de estas 14 cepas se seleccionaron 4 cepas (C1, C2, C3 y C4) que presentaron mejores condiciones de crecimiento en cultivo.

Se llevaron a cabo ensayos para evaluar el crecimiento de cepas endofíticas seleccionadas de *Alternaria* y *Colletotrichum*, utilizando medios de cultivo enriquecidos o no con hojas de *Jatropha curcas*. Los resultados revelaron que las cepas de *Alternaria* C1 y C2 mostraron un mayor crecimiento cuando las hojas de *Jatropha curcas* eran la única fuente de carbono en el medio de cultivo, mientras que las cepas C3 y C4 crecieron mejor cuando se agregó otra fuente de carbono además del aditivo de *Jatropha curcas*. Por otro lado, las cepas de *Colletotrichum* (C5 y C6) presentaron un mejor crecimiento en medios altamente enriquecidos, independientemente de la fuente de carbono utilizada.

Estos hallazgos respaldan la idea de que las hojas de *Jatropha curcas* son una fuente de nutrientes efectiva para las cepas de *Alternaria* (C1 y C2), y coinciden con los resultados obtenidos por Vargas y colaboradores (2019). En ese estudio, se evaluó el crecimiento de una cepa de *Alternaria* en medios de cultivo enriquecidos con pencas de su planta hospedante *Hylocereus megalanthus*, y se observó una mejora significativa en el crecimiento de las colonias del hongo. Ambos resultados indican respuestas similares, lo

que sugiere una tendencia consistente en cuanto a la capacidad de las cepas de *Alternaria* para utilizar fuentes de carbono vegetal provenientes de su planta hospedante. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar las interacciones entre los hongos endofíticos y los sustratos disponibles en el entorno, lo cual podría tener implicaciones en el marco de una agricultura sustentable. Sin embargo, se requiere una mayor investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y explorar el potencial de otras fuentes de nutrientes en el crecimiento y la actividad de las cepas endofíticas de *Alternaria*.

En este estudio, se exploró el potencial de las cepas de *Alternaria* como bioinoculantes y se observaron efectos sobre las plantas de *Cucumis sativus* evaluadas. Específicamente, se determinó que la cepa C2 fue la más adecuada, ya que no se observaron signos de clorosis y se obtuvieron los mayores promedios de longitud de raíz en las plántulas, sugiriendo un efecto relacionado a la promoción del crecimiento. Además, se realizaron pruebas comparativas de diferentes métodos de inoculación utilizando las cepas C1 y C2. Los resultados revelaron que el método utilizado por Estrada et al. (2013), que implica la aspersión de una suspensión de conidios en condiciones de alta humedad, fue el más efectivo. Y, por otro lado, la cepa C2 mostró el mayor porcentaje de aislamiento cuando se utilizó este método.

Estos hallazgos destacan el potencial de la cepa C2 de *Alternaria* como un bioinoculante prometedor para mejorar el desarrollo y crecimiento de las plántulas de *Cucumis sativus*. Estos resultados, junto con el método de inoculación de Estrada et al. (2013) proporcionan una estrategia práctica y eficiente para la aplicación de las cepas endofíticas de *Alternaria* en futuros estudios y aplicaciones agrícolas.

Hasta aquí, estos resultados indican que *Jatropha curcas* posee endofitos fúngicos foliares nativos, en particular aquellos pertenecientes al género *Alternaria* que presenta condiciones adecuadas para ser considerados como potenciales bioinoculantes sobre otros hospedantes de interés económico, como *Cucumis sativus*.

En cuanto a estudios de micorrización asociada a otras interacciones, Li et al. (2022) realizaron inoculaciones simultáneas de HMA y hongos endófitos (*Piriformospora indica*) en plantas de cítricos y encontraron que la inoculación con hongos endofíticos foliares no solo aumentó la tasa de micorrización en las raíces de las plantas, sino que también activó el sistema de defensa antioxidante de los cítricos de campo, lo que potencialmente aumentó la resistencia de las plantas inoculadas. En concordancia con Li y colaboradores (2022), en este trabajo se obtuvieron resultados interesantes de los ensayos de inoculación, los cuales sugieren que la cepa C2 del género podría ser responsable de una mayor micorrización en plantas de *Cucumis sativus* inoculadas con este endofito. Los ensayos de micorrización revelaron que las plantas inoculadas con la cepa endofítica C2 presentaron mejores recuentos de micorrizas (totales, arbusculos y vesículas) que las plantas no inoculadas, recreando los resultados obtenidos en *Jatropha curcas*, donde plantas E+ presentaban el mayor porcentaje de micorrización. Además, las plantas inoculadas con la cepa C2 y con hongos micorrícicos (HM) nativos presentaron un mayor porcentaje de arbusculos en comparación con las plantas inoculadas con *Gigaspora rosea*. Esto podría deberse a que, a diferencia del inóculo con *G. rosea*, se espera que el inóculo nativo sea más diverso, lo que brindaría a la planta la oportunidad de interactuar con más especies de HMA. Este resultado es interesante ya que los arbusculos son las estructuras micorrícicas más eficientes para el intercambio de nutrientes dentro de la célula radical. Estos resultados sugieren un efecto sinérgico entre

la colonización endofítica artificial y la micorrización en plantas de *Cucumis sativus*, utilizando cepas endofíticas de *Alternaria*.

Por otro lado, el análisis de los parámetros de crecimiento de plantas de *Cucumis sativus*, revelaron que el peso fresco y el peso seco de raíces de pepino (Figs. 3.7 y 3.8) presentaron valores mayores cuando las plantas son inoculadas con *Alternaria*. Estos resultados coinciden con los de Zhou y colaboradores (2018), quienes observaron que cepas endofíticas de *Alternaria* aisladas de hojas de la especie vegetal *Salvia miltiorrhiza* presentaban mayor abundancia (en comparación con otras especies endofíticas), y descubrieron que plantas de dicha especie vegetal inoculadas con una de las cepas (A13) presentaron un incremento significativo de 140% en peso fresco, 138% en peso seco. Además, observaron que la inoculación con *Alternaria* contribuyó al crecimiento de las raíces de *S. miltiorrhiza* y también estimuló el metabolismo secundario de la planta, favoreciendo su resistencia a enfermedades. Los resultados de estos autores junto con los aquí obtenidos señalan que *Alternaria* posee un potencial rol como bioinoculante. También coinciden con los resultados de Khan y colaboradores (2015), quienes descubrieron que especies del género *Alternaria* aisladas como endofitos sintetizan compuestos bioactivos que podrían desempeñar un papel importante en la promoción del crecimiento de plantas de *Solanum nigrum*.

En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la cepa endofítica de *Alternaria*, C2, proveniente de hojas de *Jatropha curcas* podría ser utilizada como bioinoculante fúngico, mejorando el desarrollo y la micorrización de raíces de plantas de interés económico, como *Cucumis sativus*. Aunque algunas cepas del género *Alternaria* son conocidas por su alta producción de micotoxinas y por ser responsables de enfermedades en plantas cultivadas (Patriarca, 2016; Fatima et al., 2019; Sohi et al., 2020;

Raspol et al., 2019), existen estudios que sugieren su potencial como bioinoculantes. El trabajo de Zhou y colaboradores (2018) es un claro ejemplo de que cepas de *Alternaria* asiladas como endofitos pueden ser utilizadas como bioinoculante, y los resultados presentados en este trabajo coinciden con dicha afirmación. Sin embargo, resulta claro que se necesitan muchos ensayos para corroborar su efecto en otras especies vegetales y posibles impactos ambientales negativos.

Capítulo 4

Estudio óptico de la actividad de biospeckle en hojas de *Jatropha curcas* L. Una evaluación no invasiva e indirecta de la colonización de endofitos foliares.

Abreviaturas Capitulo 4:

LBSA: laser biospeckle activity

E+: plantas colonizadas por endofitos ambientales (colonización endofítica >25%)

E-: plantas cubiertas con una barrera (plástico transparente) para evitar la colonización por inóculo ambiental (colonización endofítica < 25%.)

PF: peso fresco de toda la planta (vástago + raíz)

PS: peso seco de toda la planta (vástago + raíz)

LR: largo de raíz

LV: largo de vástago

LT: largo total de la planta (LR + LV)

WGD: diferencias generalizadas ponderadas

nWGD: diferencias generalizadas ponderadas y normalizadas

MxF: frecuencia máxima, recuento de los valores de nWGD que caen en cada bin, o punto.

4.1 Introducción

Hay un creciente interés en estudiar a los endofitos foliares debido a los múltiples procesos en los que están involucrados y las interacciones del microbioma de las hojas con sus hospedantes (Lindow & Brandl, 2003; Rodriguez et al., 2009; Persoh, 2015; Pandey et al., 2016; Vurukonda et al., 2018; Zhou et al. 2018; Li et al., 2019).

Nuestra capacidad de visualizar las complejas interacciones en el microbioma nos ayuda a entender los diferentes roles que los endofitos pueden jugar. Investigar sobre los potenciales beneficios de los hongos endofíticos, como la protección a la herbivoría o resistencia a algún tipo de estrés, involucra el estudio de plantas colonizadas por endofitos (E+) que necesitan ser monitoreadas y diferenciadas de plantas no colonizadas por estos organismos (E-).

La detección de endófitos se realiza comúnmente mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo. Las técnicas dependientes de cultivo implican el aislamiento de hongos utilizando medios de cultivo adecuados para promover su crecimiento. Por otro lado, las técnicas independientes de cultivo se basan en la extracción y análisis de ADN de los hongos endofíticos directamente de los tejidos vegetales. Además, se pueden utilizar técnicas histológicas para microscopía con el fin de visualizar los endófitos en los

²Este capítulo fue publicado: D’Jonsiles, M. F., Galizzi, G. E., Dolinko, A. E., Novas, M. V., Ceriani Nakamurakare, E., & Carmarán, C. C. (2020). Optical study of laser biospeckle activity in leaves of *Jatropha curcas* L.: a non-invasive and indirect assessment of foliar endophyte colonization. *Mycological Progress*, 19(4), 339-349.

tejidos. Todos estos métodos conllevan la destrucción del tejido vegetal, lo que puede resultar en la pérdida de especímenes. Además, puede dificultar la planificación de los diseños experimentales y complicar el análisis estadístico, sobre todo cuando hay limitaciones en la disponibilidad de ejemplares para el estudio. Estos factores a menudo escapan al control del investigador, lo que agrega aún más dificultad a la situación

En este contexto, la utilización de técnicas no invasivas ofrece importantes beneficios y mejora nuestra capacidad de detectar organismos *in situ* sin dañar el tejido vegetal. Se han desarrollado diversas técnicas no destructivas para detectar enfermedades en plantas, tales como la utilización y procesamiento de imágenes, (fluorescencia e hiperespectrales), espectroscopia y teledetección (Ali et al., 2019).

Recientemente, ha surgido una técnica innovadora basada en el análisis de la actividad biospeckle en tejidos vegetales. Esta técnica se ha utilizado para diversas aplicaciones, como la caracterización de tejidos radiculares (Schoot et al., 2020), la detección de metales pesados en plantas acuáticas (Muhammat et al., 2023) y la evaluación del efecto de la pulverización de tejido foliar con un spray que contiene una hormona de crecimiento (Rajagopalan et al., 2020), entre otros usos. Esta novedosa técnica proporciona una herramienta prometedora para la investigación y el monitoreo de diferentes aspectos relacionados con los tejidos vegetales y su respuesta a diversos estímulos o condiciones ambientales. El efecto de speckle se produce cuando la luz coherente, como la que proviene de un láser, es dispersada en una superficie rugosa o se transmite a través de un medio con variaciones aleatorias en su índice de refracción. El campo óptico resultante es el resultado de la interferencia de la luz dispersada por las inhomogeneidades ópticas distribuidas aleatoriamente en el medio. Como resultado, la distribución de la intensidad de la luz muestra una estructura granular conocida como patrón de speckle (Fig 4.1).

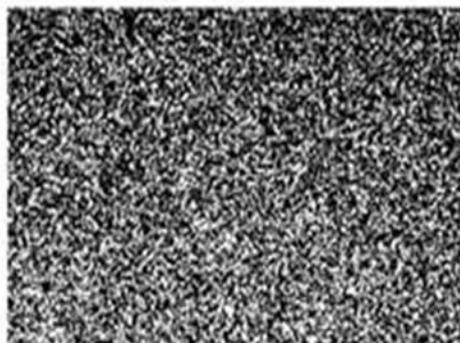


Figura 4.1: Una superficie rugosa es iluminada con luz coherente (por ejemplo, un láser) que es dispersada debido a las inhomogeneidades, y presenta el típico patrón de speckle, moteado o granular (fuente: <https://www.foodinfotech.com/biospeckle-laser-concepts-application-and-challenges/>)

Si el medio en el cual se dispersa la luz presenta algún tipo de actividad que modifique el camino óptico de la luz interferente, por ejemplo, movimientos micrométricos o pequeñas variaciones en el índice de refracción, el patrón de speckle resultante cambia en el tiempo y la apariencia visual es similar a la de un líquido hirviendo. Este efecto se denomina “Speckle dinámico”. El estudio de la evolución temporal del speckle dinámico es ampliamente conocido como una técnica “sin contacto” o “no destructiva” utilizada para caracterizar los parámetros involucrados en el proceso que genera actividad del medio dispersante (Rabal & Braga Jr., 2008). Si el medio dispersante es una muestra biológica, el efecto se conoce como “biospeckle” (Fig 4.2). En ese caso, la actividad observada es el resultado de movimientos en el interior del tejido vivo y puede ser atribuido a muchos procesos, como el crecimiento y la división celular, movimientos citoplasmáticos, reacciones biomecánicas o actividades relacionadas con el agua (Zdunek et al., 2014; Ansari & Nirala, 2015). El estudio de la actividad Biospeckle, también conocida como laser biospeckle o LBSA (laser biospeckle activity) ha sido aplicado para analizar diferentes procesos como la actividad en semillas de plantas, detección de flujos sanguíneos, visualización de perfusión de tejidos, perfusión de quemaduras, maduración

de frutas y evaluación de sistema vascular en las plantas (Zdunek et al., 2014; Zhong et al., 2014; Ansari & Nirala, 2015). En referencia a los hongos esta técnica fue aplicada para detectar hongos patógenos en semillas (Mancini et al., 2016) o para testear la eficiencia de pesticidas (Silva et al., 2018), evaluando su actividad biológica con resultados prometedores. Sin embargo, actualmente no se han realizado estudios que utilicen el método de actividad biospeckle para detectar la presencia o ausencia de endofitos fúngicos en plantas. Por lo tanto, resulta de gran interés investigar si esta técnica puede utilizarse para identificar la presencia de estos organismos o algún indicador indirecto de su existencia.

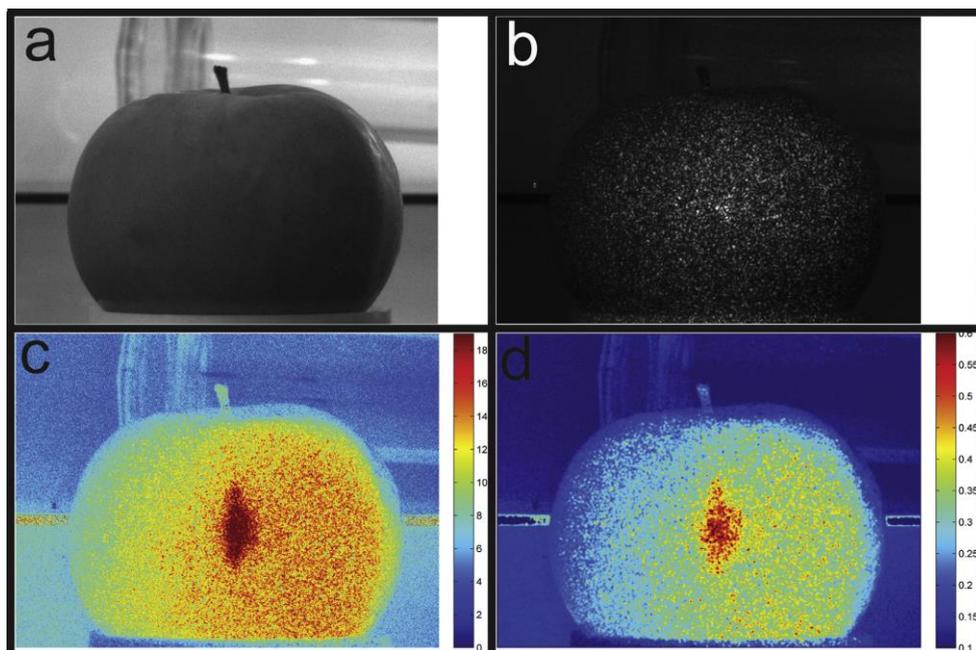


Figura 4.2: a) vista real y b) imagen de y actividad de Biospeckle espacial de una manzana, visualizada por dos coeficientes: Fujii (c) y LASCA (d). Este ejemplo muestra que las imágenes de biospeckle permiten distinguir áreas intactas y dañadas (mancha oscura en el centro de la manzana) incluso cuando el daño es externamente invisible (Zdunek et al., 2014).

4.2 Objetivos e hipótesis

La hipótesis de este trabajo es:

*Los métodos no invasivos como Láser Biospeckle Activity (LBSA) permiten la detección temprana de colonizaciones endofíticas en *Jatropha curcas*.*

El objetivo de este trabajo fue:

Evaluar la potencialidad del método Laser Biospeckle Activity (LSBA) para determinar, de manera no invasiva, la colonización de hojas por parte de endofitos foliares.

Para alcanzar este objetivo se validaron las diferencias entre la lámina y las venas de las hojas estudiadas, colonizadas o no colonizadas con endofitos, y también se analizaron los parámetros de crecimiento de las plantas estudiadas y su correlación con los parámetros de LBSA.

4.3 Materiales y métodos

Material vegetal

Al igual que en los capítulos 1 y 2 de este trabajo, se utilizaron semillas de *Jatropha curcas* L donadas por el Ingeniero Diego Wassner (Cátedra de Cultivos Industriales, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina). Las mismas fueron colectadas de plantaciones experimentales de *Jatropha curcas* situadas en Siete Palmas, Formosa, Argentina (25° 13' 21.04"S, 58° 17' 59.67"W).

Para realizar los ensayos que se detallarán en las siguientes secciones, se llevaron a cabo diferentes procedimientos que permitieron obtener plantas de *Jatropha curcas* con

diferentes estatus de colonización endofítica y así analizar el tejido foliar para determinar la LBSA. Para poner a prueba los resultados, también se analizaron el porcentaje de colonización a través de estudios de cultivos. Adicionalmente, se evaluaron indicadores de biomasa. Para ello 14 plantas (7 E+ y 7 E-) se cultivaron durante 4 meses (de enero a abril de 2017). Para llevar a cabo el análisis por LBSA y el análisis endofítico se eligieron 14 hojas de las mismas plantas (7 E+ y 7 E-). Una vez obtenidos los parámetros de LBSA, dichas hojas se utilizaron para evaluar la colonización endofítica por métodos dependiente de cultivos, así como la biomasa y parámetros de crecimiento.

Área de estudio

Los experimentos realizados en el presente estudio se llevaron a cabo en un campo experimental de la localidad de Boulogne, en la provincia de Buenos Aires (34° 32' 31" S, 58° 26' 24" W, altitud 9 m, Buenos Aires-Argentina.

Las mediciones ópticas se realizaron en el Instituto de Física de Rosario (IFIR CONICET – ROSARIO) en la Universidad Nacional de Rosario, provincia de Santa Fe, Argentina.

Estatus endofítico

Al igual que en los capítulos 1 y 2 se establecieron dos estatus endofíticos de las plantas de *Jatropha curcas*: plantas que se mantuvieron expuestas al medio ambiente para que fueran colonizadas por los endofitos ambientales constituyeron el estatus E+, y plantas que fueron cubiertas con un plástico transparente, con el fin de evitar la colonización natural de endofitos ambientales constituyeron el estatus E-. En este caso, se consideró

un umbral del 25% de colonización endofítica, por lo que plantas E+ tuvieron una colonización endofítica $\geq 25\%$ y plantas E- una colonización endofítica $< 25\%$.

Diseño experimental

El diseño experimental de esta etapa del trabajo se basó en un diseño de un solo factor: estatus endofítico, que contó con dos niveles (E+ o E-).

Preparación de las macetas

Para llevar a cabo los ensayos de este capítulo, 120 semillas de *Jatropha curcas* se hicieron germinar en bandejas plásticas y transferidas a macetas de 12 cm³ con suelo comercial (Terrafertile S.A.) hasta obtener plantas jóvenes. Del total de plántulas, se seleccionaron 24 que no presentaban signo ni síntoma de ninguna enfermedad, descartándose las demás. De las 24 plantas seleccionadas, 10 se utilizaron en un pre ensayo cuyo objetivo fue determinar la edad específica en la cual las hojas poseen la mayor carga endofítica, y las 14 restantes fueron utilizadas para el análisis de LBSA.

Análisis de la infección y colonización endofítica

Análisis preliminares para la determinación de la edad en que las plantas llegan a su máxima infección endofítica

Se llevó a cabo un análisis preliminar con el objetivo de determinar el momento de máxima infección endofítica en las plantas, para poder aplicar de manera más precisa el método de LBSA. Diez plantas se cultivaron durante cuatro meses expuestas al ambiente

para facilitar la infección natural de inoculo endofítico presente en el ambiente. Durante esos meses se permitió que en las plantas coexistan los cotiledones (persistentes en *Jatropha curcas*) y hojas de 2, 4, 6, 8 y 10 días de edad, a partir de los cuales se realizaron los aislamientos.

Caracterización de la comunidad endofítica

Para los diferentes procedimientos llevados a cabo, hojas o cotiledones (según correspondiera) fueron analizados. Cada hoja o cotiledón se cortó en fragmentos de aproximadamente 2 x 2 cm. En el caso de las hojas analizadas mediante LBSA, los aislamientos de endofitos se realizaron a partir de fragmentos ubicados específicamente en el área de la hoja analizada por el método. Esta región incluía tanto partes de la lámina como de las nervaduras (ver Figura 4.3).

Todos los fragmentos, incluidos aquellos correspondientes a las áreas previamente analizadas por LBSA, se esterilizaron superficialmente utilizando la siguiente secuencia de inmersión: 1 min en etanol 70%, 2 min en una solución de hipoclorito de sodio 4%, y 30 seg en etanol 50%. Cada fragmento fue luego transferido a placas de Petri de 90 mm conteniendo MEAch: Extracto de Malta (OXOID) 2%, Agar (Difco) 2% y suplementado con cloranfenicol (SIGMA ALDRICH) 1%. Las placas se incubaron a 24 °C en oscuridad por seis días y revisadas periódicamente. El micelio que emergió de los fragmentos fue aislado, purificado, transferido a placas de Petri con MEAch, y almacenado a 4 °C en oscuridad. Una vez obtenidos los cultivos puros, se registró el porcentaje de aislamientos de endofitos utilizando la siguiente fórmula:

AT= (número de aislamientos endofítico de cada tratamiento/ número de aislamientos totales) *100

También se calculó la frecuencia de endofitos aisladas a partir de hojas de *Jatropha curcas* de los diferentes tratamientos, según la fórmula:

FA (Frecuencia de aislamientos de géneros) = (Número de fragmentos con aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados) * 100

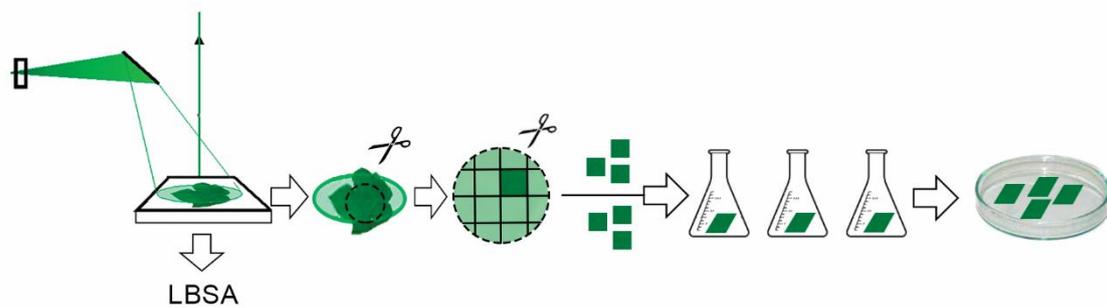


Figura 4.3: Diferentes procedimientos llevados a cabo en este trabajo. Las hojas de *Jatropha curcas* primero se analizadas por su actividad de biospeckle con láser (LBSA, del inglés laser biospeckle activity), y luego, las áreas foliares estudiadas por SBSA, se cortaron en segmentos, se colocaron en placas de Petri con un medio de cultivo nutritivo (MEAch) para posteriormente aislar los endofitos que crecieron a partir de cada fragmento. Este es un esquema simplificado que muestra una hoja separada de la planta, sin embargo, el ensayo se llevó a cabo con las plantas intactas para evitar que los resultados obtenidos se vean afectados por artefactos técnicos.

Identificación de endofitos

Para identificar morfológicamente a los endofitos aislados en cada tratamiento se procedió de la misma manera que en los capítulos 1 y 2.

Análisis de la biomasa y parámetros de crecimiento vegetal

Luego de cuatro meses, todas las plantas se cosecharon y se registró el peso fresco total (PF) (vástago + raíz) de cada una. Los pesos secos (PS) de las plantas (vástago + raíz) se registraron luego de ser secados en estufa (a 60 °C hasta obtener un peso constante). También se midieron el largo de raíces (LR), vástagos (LV)) y el largo total (LT).

Análisis de datos de Biospeckle

De entre las 14 plantas asignadas a las categorías E+ o E- (7 E+ y 7 E-), se eligieron 7 plantas por categoría (aquellas que no presentan síntoma ni signo de ninguna enfermedad), y una hoja por planta se utilizó para el análisis de LBSA.

La determinación de la actividad de biospeckle está basada en la adquisición de una secuencia temporal $\{I_1, I_2, \dots, I_N\}$ de la muestra iluminada, donde N es el número total de imágenes grabadas. Luego, la intensidad de luz detectada para cada píxel de las imágenes adquiridas durante el tiempo de monitoreo es procesada por un método computacional. Se han desarrollado diferentes métodos para caracterizar la actividad de biospeckle, y la elección de un enfoque específico depende de la naturaleza del fenómeno en estudio.

En situaciones donde la actividad de speckle no es uniforme sobre la muestra, procesamientos de imágenes basados en técnicas como los métodos de Fujii, Fujii parametrizada ponderada (en inglés *weighted parameterized Fujii*), diferencias generalizadas (GD, del inglés *generalized differences*), o diferencias generalizadas ponderadas (WGD, del inglés *weighted generalized differences*), son eficientes para caracterizar la actividad detectada (Rabal & Braga Jr., 2008; Ansari & Nirala, 2015; Arizaga et al., 2002).

Con el objetivo de analizar la actividad de biopeckle en hojas de *Jatropha curcas*, utilizamos el coeficiente WGD definido en coordenadas (x,y) de píxel como:

$$WGD_{(x,y)} = \sum_{K=1}^{N-\Delta} \sum_{\delta=1}^{\Delta} |l_K(x,y) - l_{k+\delta}(x,y)| p_{\delta}$$

donde I_k es la intensidad de la k-ésima imagen, $|\cdot|$ representa el operador de valor absoluto, p_{δ} son pesos definidos por el usuario, N es el número total de imágenes adquiridas y Δ es el número de imágenes consecutivas a considerar en el cálculo de las diferencias. En resumen, todas las posibles diferencias entre las imágenes consecutivas Δ se suman en valor absoluto para cada píxel, y este procedimiento se repite para las primeras imágenes $N - \Delta$ de la secuencia registrada. Finalmente, la acumulación de las diferencias evaluadas da como resultado el coeficiente WGD en las coordenadas de píxeles (x, y). En este estudio, establecemos $N=2000$, $\Delta=10$ y $p_{\delta}=1$ para cada $\delta=1, \dots, \Delta$.

Como cada valor $I_k(x, y)$ se resta al valor absoluto de todos los demás valores en la misma ubicación, el resultado no depende del orden de aparición de los valores de intensidad. Resulta que el WGD es mínimo cuando todos los $I_k(x, y)$ son aproximadamente iguales, es decir, la actividad es baja o inexistente, o alta cuando todos los $I_k(x, y)$ son muy diferentes. Por el contrario, se puede ver que el valor WGD es máximo cuando los valores $I_k(x, y)$ en el histograma de tiempo se distribuyen uniformemente cerca de los límites del intervalo de nivel de grises. Esto es así cuando el valor más bajo ocurre la mitad del tiempo, y la otra mitad, aparece el valor más alto. En este caso, el intervalo de nivel de gris está entre 0 y 255. Por lo tanto, si el histograma de

los valores de intensidad de un píxel en función del tiempo muestra dos o más modos (es decir, máximos), el valor del WGD es mayor cuando los modos están más separados.

Si los pesos de $p\delta$ se establecen en cero para todos los valores de δ excepto para los más pequeños, las variaciones relativamente rápidas mejorarán con respecto a las más lentas. Por otro lado, cuando los procesos son muy lentos con respecto al tiempo de adquisición y sus variaciones están ocultas por el ruido, es más conveniente comparar solo los cuadros que tienen una separación de tiempo significativa. Es decir, los pesos de $p\delta$ se establecen en cero para valores pequeños de δ y en uno por algún intervalo de tiempo en el que se espera que el proceso muestra variaciones significativas (Rabal & Braga Jr. 2008; Arizaga et al., 2002). En este trabajo, la variable WGD se normalizó, por lo que a partir de ahora será nWGD.

Configuración óptica

La figura 4.4 muestra un diagrama de la configuración óptica utilizada en los experimentos. En este estudio, se utilizó un láser de luz verde para minimizar la luz absorbida por las hojas y poder obtener la información de la superficie de la hoja. De esta manera, el objetivo fue minimizar la interferencia con los fotosistemas de las hojas. La luz verde de un láser Nd: YAG (modelo coherente Compass 315M, 100 mW, λ 532 nm) se expande por medio de la lente expansora (L) y se dirige a la muestra (S) por medio de un espejo de iluminación (M1). La luz dispersada por la muestra se dirige a la cámara de video de alta velocidad (modelo Dalsa CA-D6), impulsada externamente por el capturador de fotogramas (Coreco Imaging PC-DIG) mediante un espejo de observación (M2). La resolución de las imágenes adquiridas fue de 256 x 256 píxeles y 256 niveles de gris. La velocidad de fotogramas de la cámara se estableció en 25 imágenes por

segundo y cada conjunto de datos contenía 2000 imágenes. El espécimen S (es decir, la hoja de la planta) yace horizontalmente sobre una placa de soporte sujeta al banco óptico. Además, la hoja está cubierta por una placa acrílica transparente para evitar movimientos espurios de la hoja. El ensamblaje de las plantas en el banco óptico se muestra en la figura 4.5 a, y la figura 4.5 b representa la configuración óptica durante las mediciones de LBSA.

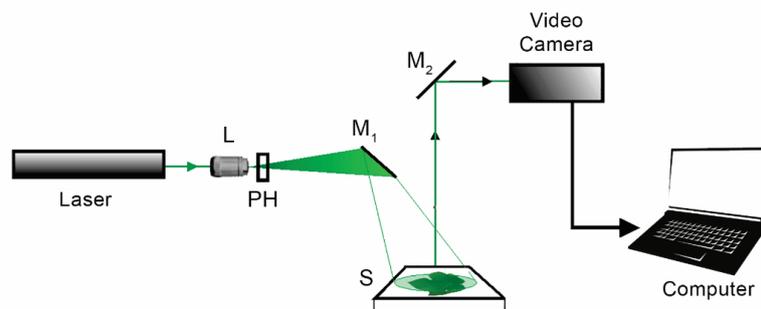


Figura 4.4: Diagrama del montaje experimental: expansor de lente (L), pequeño orificio (PH, del inglés pin hole), espejo de iluminación (M1, del inglés mirror 1), espejo de observación (M2, del inglés mirror 2), espécimen (S).

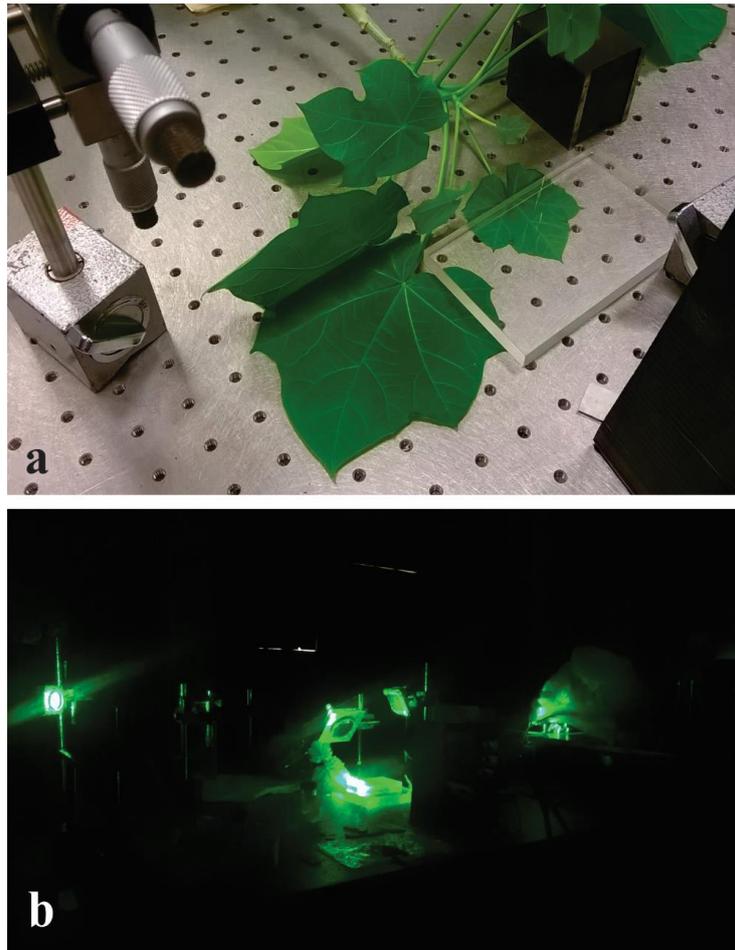


Figura 4.5: Montaje de una hoja de *Jatropha curcas* en el banco óptico (a) y montaje óptico (b) durante las mediciones.

Procesamiento de imágenes

Las secuencias de imágenes biospeckle se procesaron mediante la evaluación del coeficiente WGD. Este coeficiente se evaluó independientemente para cada píxel de la secuencia de imágenes. Finalmente, se obtuvo una matriz que contiene el valor del coeficiente WGD para cada píxel.

Para minimizar la influencia de los cambios en el color y la reflectancia de cada hoja analizada, u otras variables de superficie desconocidas de diferentes hojas, la matriz WGD de cada hoja se dividió por su valor máximo en la misma matriz, resultando en una

matriz WGD normalizada (nWGD). De esta manera, se obtuvo una matriz que va de 0 a 1, donde la unidad corresponde al valor máximo de nWGD obtenido para cada secuencia de imágenes. Luego, se calculó el histograma correspondiente a cada matriz de nWGD, Para construir el histograma, el rango de valores de nWGD se dividió en 256 intervalos consecutivos no superpuestos de igual tamaño. Luego, se contó cuántas veces los valores de nWGD cayeron en cada intervalo. y este valor de conteo se denomina frecuencia. En consecuencia, el histograma es una estimación de la distribución de probabilidad de nWGD porque cuanto mayor es el recuento (o frecuencia), mayor es la probabilidad de que ocurra un valor de nWGD. Finalmente, se comparó la frecuencia máxima (MxF) y los valores de nWGD correspondientes para todas las muestras, y para ello se construyó un polígono de frecuencias acumuladas a partir de cada histograma.

Análisis estadístico

Para comparar las diferencias entre las plantas E+ y E- entre todas las variables, se realizó una prueba de Kruskal Wallis para las variables: nWGD (diferencias generalizadas ponderadas normalizadas); MxF (frecuencia máxima); PF (peso fresco); PS (peso seco); LR (longitud de la raíz); LV (longitud del tallo); LT (longitud total). Se estudió la relación (o correlación) entre estas variables y la frecuencia de aislamientos de endofitos utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Para complementar estos análisis, también se realizó un análisis multivariado a través del análisis de componentes principales (PCA), con el objetivo de identificar grupos de plantas que mostraran patrones similares con respecto a las variables de LBSA y de crecimiento de las plantas. Este análisis se llevó adelante a partir de 10 plantas (5 E+ /5 E-). Las 4 plantas restantes se descartaron dado que presentaron patrones de Biospeckle

difíciles de interpretar. Como las variables MxF y LT se obtuvieron directamente de nWGD y la suma de LR y LV, respectivamente, se excluyeron del análisis para evitar la redundancia. Al analizar el conjunto de datos original de variables cuantitativas, no se encontraron valores atípicos potenciales y se cumplieron todos los supuestos. Dado que las variables se expresan en diferentes escalas de medición, calculamos un PCA en la matriz de correlación para estandarizar las variables. Todos los análisis se realizaron con R versión 3.4.3 2 (R Development Core Team, 2017).

4.4 Resultados

Análisis de la colonización endofítica

Los resultados del estudio preliminar de colonización endofítica para determinar el momento en que las plantas alcanzan su mayor carga endofítica (Tabla 4.1) revelaron que los cotiledones y las hojas de 2 días no mostraron colonización endofítica. Por otro lado, se observó que las hojas de 10 días presentaron una carga endofítica superior a las hojas de 4, 6 y 8 días.

Por lo tanto, los análisis posteriores se realizaron en hojas de plantas de 10 días de edad con y sin exposición a infección natural (plantas E + y E- respectivamente).

Tabla 4.1: Porcentajes de endofitos aislados (AT= (número de aislamientos endofítico de cada tratamiento/ número de aislamientos totales) *100) de los ensayos preliminares de cotiledones (Cot) y hojas de *Jatropha curcas* de 2, 4, 6 y 10 días, expuestas a la colonización natural

Tejido estudiado	AT (%)
Cotiledón	0
Hojas de 2 días	0
Hojas de 4 días	6.667
Hojas de 6 días	9.266
Hojas de 8 días	24.427
Hojas de 10 días	60.632

Análisis de endofitos de las plantas utilizadas para medir LSBA

Las hojas de las plantas E- registraron porcentaje de aislamiento endofítico (AT) entre 0 y 25%, mientras que las plantas E+ mostraron valores entre 25 y 100% (Tabla 4.2). Los géneros de endofitos obtenidos de las hojas E+ y E- de *Jatropha curcas* fueron: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Nigrospora*. Las frecuencias de aislamiento (expresada en %) de los géneros de hongos obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2: Porcentaje de endofitos aislados de hojas E- (colonización endofítica <25%) o E+ (colonización endofítica > 25%) de *Jatropha curcas*. Las hojas E+ se expusieron 10 días a la colonización natural, las hojas E- no. Todos los segmentos analizados fueron esterilizados superficialmente.

AT (%) en hojas	
E- (<25%)	E+(≥25%)
0	25
0	50
0	62
0	62
0	75
13	100
24	100

Tabla 4.3: Frecuencias de endofitos (FA (Frecuencia de aislamientos) = (Número de fragmentos con aislamientos endofíticos pertenecientes a un género / Total de fragmentos analizados) * 100. aislados a partir de hojas E+ (colonizadas con endofitos) o E- (libres de endofitos) de *Jatropha curcas*.

Género	FA (%)	
	E+	E-
<i>Alternaria</i>	11	2
<i>Aspergillus</i>	45	2
<i>Colletotrichum</i>	-	2
<i>Nigrospora</i>	4	-
<i>Mycelia sterilia</i>	13	-

Análisis de la actividad láser biospeckle LBSA

Tanto las variables de crecimiento de las plantas, así como las de LBSA, con excepción de nWGD, mostraron mayores valores en las plantas E- en comparación con las E+ (Tabla 4.4). La prueba de Kruskal Wallis muestra que las diferencias observadas fueron significativas para las variables LR ($H = 8.92, p = 0.0024$), PS ($H = 7.62, p = 0.0057$), LV ($H = 22.5, p = 0.05$) y LT ($H = 1.97, p = 0.0598$) mientras que no fueron significativas para PF ($H = 1.65; p = 0.19$) (Fig. 4.6 a y b). En el caso de las variables de LBSA, los resultados para nWGD y MxF mostraron diferencias significativas en ambos casos entre las hojas E + y E- ($H = 6.86, p = 0.0089; H = 6.81, p = 0.009$ respectivamente) (Fig. 4.6 c y d respectivamente).

Las imágenes nWGD de las secuencias de imágenes punteadas de las hojas evaluadas para E+ y E- mostraron diferencias notables. El nWGD para los casos E- estudiados mostró valores más bajos en la lámina de la hoja que en las nervaduras (Fig. 4.7 a-b). Por el contrario, el nWGD para los casos E + mostró valores en el mismo orden de magnitud para las nervaduras y la región de la lámina como se muestra en la Fig. 4.7 (c y d). La frecuencia del valor de nWGD está representada por los polígonos de frecuencias

acumuladas (Fig. 4.8), en función del rango de nWGD. Los datos obtenidos mostraron dos picos diferentes, correspondientes a E+ vs hojas E-.

Tabla 4.4: Valores obtenidos de E- (<25% de aislamiento), o E+ (>25% de aislamiento) de hojas de *Jatropha curcas* para todas las variables estudiadas: nWGD (diferencias generalizadas ponderadas normalizadas); MxF (frecuencia máxima); PF (peso fresco); PS (peso seco); LR (longitud de la raíz); LV (longitud del tallo); LT (longitud total), (*) valores adimensionales, (**) valores en g, (***) valores en cm. Se muestran también los valores promedio y el desvío estándar para cada variable estudiada.

Hojas	(*)nGDV	(*)MxF	(**)PF	(**)PS	(***)LR	(***)LV	(***)LT
E- (<25%)	0.203	547	12.38	15.41	14	22	36
	0.217	609	10.53	11.51	16	20	36
	0.221	634	12.31	8.59	10	25	35
	0.221	557	11.84	12.52	13	21	34
	0.224	501	8.59	1.82	17	23	40
	0.242	498	10.53	11.51	16	20	36
	0.285	439	11.84	12.52	13	21	34
promedio	0.230	540.714	11.146	10.554	14.143	21.714	35.857
desvío estándar	±0.018	±52.6122	±1.082	±3.0567	±1.877	±1.387	±1.306
E+(≥25%)	0.281	399	3.1	0.55	10	14	24
	0.285	432	3.1	0.55	10	14	24
	0.296	498	7.21	1.31	9	17	26
	0.314	403	3.04	0.65	8	15	23
	0.342	353	7.21	1.31	9	17	26
	0.371	373	5	1.17	11	19	30
	0.392	368	5	1.17	11	19	30
promedio	0.326	403.714	4.809	0.959	9.714	16.429	26.143
desvío estándar	±0.036	±35.020	±1.481	±0.321	±0.898	±1.796	±2.204

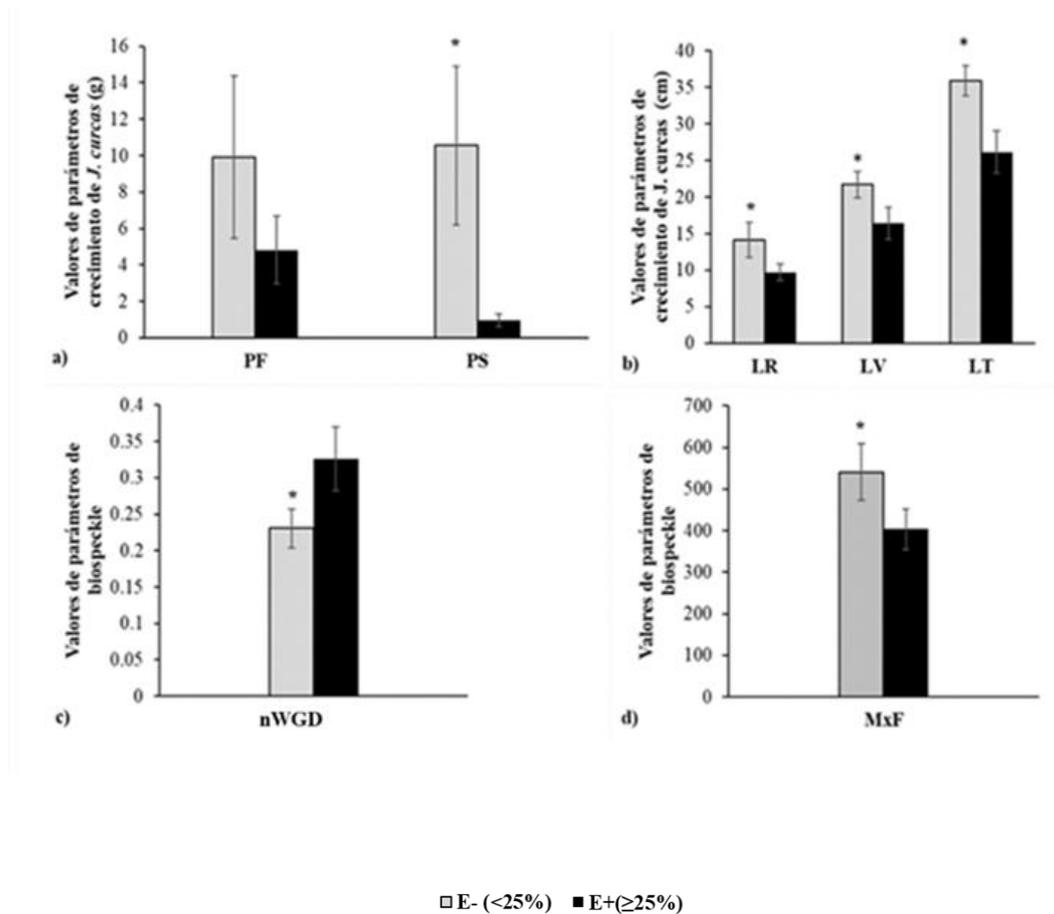


Figura 4.6: Gráfico de barras que muestra la prueba de Kruskal-Wallis para plantas E+ y E- con su desviación estándar: a) variables de biomasa (PS: peso seco y PF: peso fresco) y parámetros de crecimiento (LR: longitud de raíz, LV: longitud de tallo y LT: longitud total), b) y c) diferencias para las variables LBSA (actividad biospeckle) (nWGD: diferencias generalizadas ponderadas normalizadas, y MxF: frecuencia máxima respectivamente). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las plantas E- y E+ para cada variable analizada.

Análisis de correlación de variables

A continuación, se presenta la matriz con los coeficientes de correlación de Pearson entre variables de biospeckle y de crecimiento, con la incorporación de la frecuencia de aislamientos de endofitos (Tabla 4.5), así como la matriz con los p-valores asociados a dichos coeficientes (Tabla 4.6). Los resultados más destacados son la correlación negativa significativa de nWGD con las variables PS y LR. Se observa también que hay una

correlación significativa negativa de la variable LT con las variables PF, PS y LV, y una correlación significativa positiva entre las variables LV y PF, y PS y PF.

Tabla 4.5: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de Biospeckle (nWGD) y parámetros de crecimiento (PF, PS, LR y LV), incorporando la frecuencia de endofitos (AT).

	nWGD	PF	PS	LR	LV	LT
nWGD	1	-0.24	-0.64	-0.68	-0.17	0.57
PF	-0.24	1	0.73	0.31	0.88	-0.81
PS	-0.64	0.73	1	0.5	0.47	-0.81
LR	-0.68	0.31	0.5	1	0.33	-0.57
LV	-0.17	0.88	0.47	0.33	1	-0.77
LT	0.57	-0.81	-0.81	-0.57	-0.77	1

Tabla 4.6: p-valores asociados a los coeficientes de Pearson (Tabla 4.5), para las variables estudiadas: Biospeckle (nWGD y parámetros de crecimiento (PF, PS, LR y LV) y frecuencia de endofitos (AT). Los asteriscos (*) muestran las correlaciones significativas.

	nWGD	PF	PS	LR	LV	LT
nWGD	NA	0.5	0.05*	0.03*	0.64	0.09
PF	0.5	NA	0.02*	0.38	0*	0*
PS	0.05*	0.02*	NA	0.14	0.17	0*
LR	0.03*	0.38	0.14	NA	0.35	0.09
LV	0.64	0*	0.17	0.35	NA	0.01*
LT	0.09	0*	0*	0.09	0.01*	NA

Análisis multivariado

Como resultado del PCA basado en variables de crecimiento, incluido nWGD, la proporción de varianza que representaron los dos primeros ejes fue del 85% (Eje 1 = 60%; Eje 2 = 25%). El Eje 1 se asoció positivamente con nWGD y negativamente con peso seco (PS), peso fresco (PF), longitud de la raíz (LR) y longitud del vástago (LV). El Eje 2 se asoció positivamente con nWGD, LV y PF y este eje se asoció negativamente con LR. La representación gráfica de los ejes mencionados, evidenció la formación de dos grupos como consecuencia de la distribución espacial de las plantas. El grupo ubicado en

los cuadrantes II y III (valores negativos del Eje 1) fue formado por las plantas 1–5, todas E⁻, asociadas a los valores más altos de PS, PF, LR y LV y los valores más bajos de nWGD, mientras que el grupo situado en los cuadrantes I y IV (valores positivos del Eje 1) incluyó a las plantas 6-10, todas E⁺, que mostraron los valores más altos de nWGD y los valores más bajos de las otras variables (Fig. 4.9). La planta 6 (E⁺) se ubicó en el extremo positivo del Eje 2, mostrando el valor más alto de nWGD y valores más altos de PF, PS y LV, en comparación con el resto de las plantas E⁺.

El coeficiente de Pearson ($r = 0.91$; $P = 0.001$) entre los puntajes del Eje I y el porcentaje de aislamiento de endofitos (AT) indicó una asociación positiva y significativa entre estos vectores.

Diferencias generalizadas ponderadas y normalizadas (nWGD)

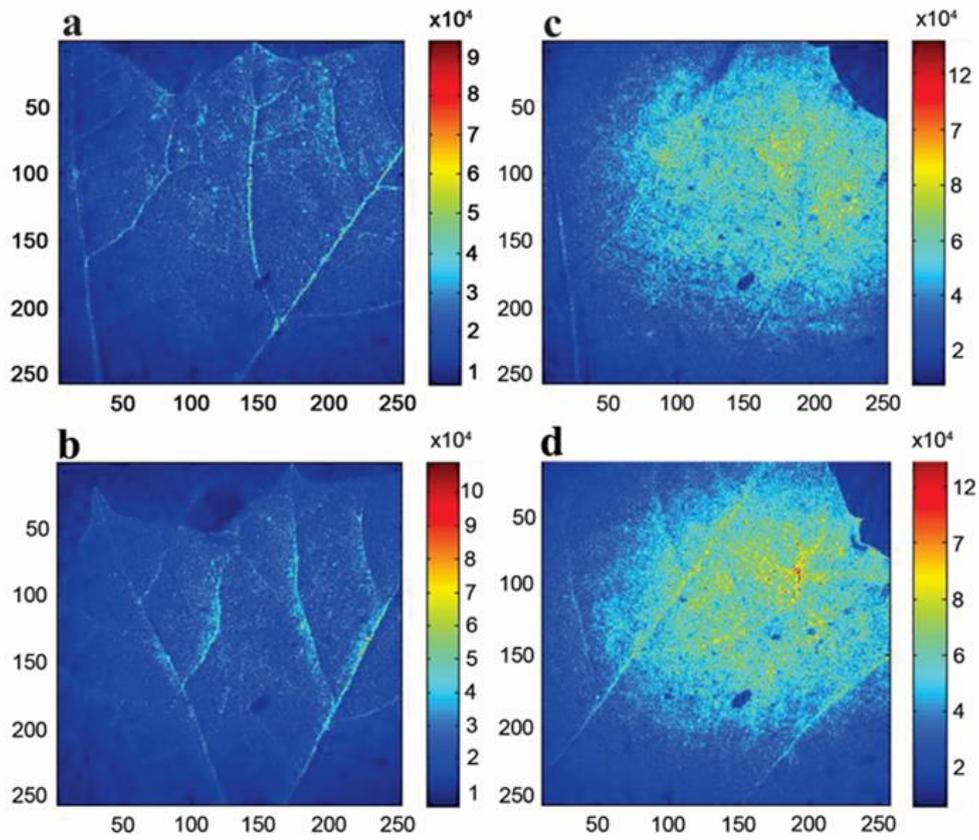


Figura 4.7: Las imágenes representativas de la actividad biospeckle obtenidas de las plantas analizadas, a) y b) representan hojas E⁻ (libres de endofitos), c) y d) representan hojas E⁺ (infectadas con endofitos). Tener en cuenta que los valores más altos están representados en rojo.

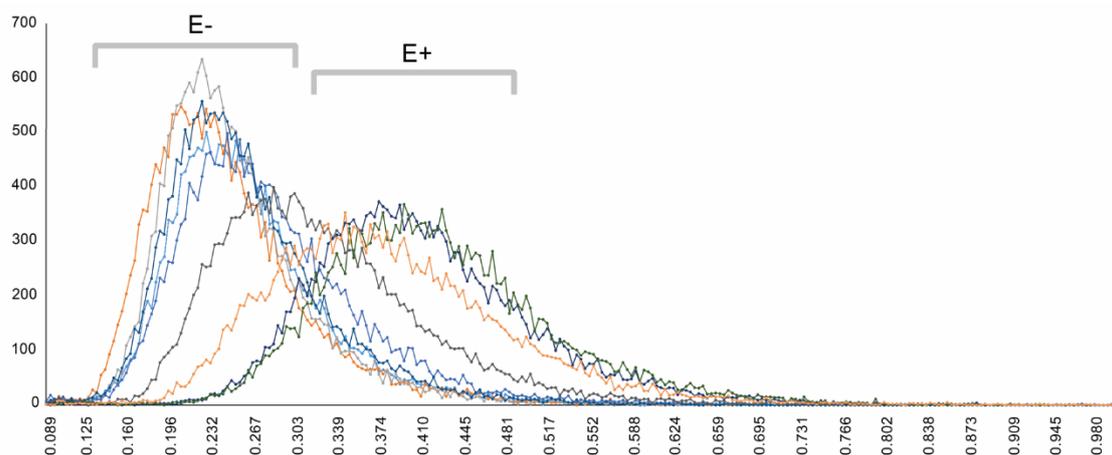


Figura 4.8: Valores de nWGD obtenidos después del análisis de datos de Biospeckle. Se observa que los valores más bajos de nWGD (diferencias generalizadas ponderadas normalizadas) con valores altos de MxF (frecuencia máxima) corresponden a hojas E⁻, mientras que los valores más altos de nWGD con valores bajos de MxF corresponden a plantas E⁺. El eje Y representa la frecuencia, el eje X representa el valor de nWGD. Cada color representa el polígono de frecuencias acumuladas para una hoja analizada. En el gráfico no se muestran todas las hojas analizadas. Esto se debe a que las líneas se superponen, lo que dificultaría la lectura del gráfico.

PCA – datos de Biospeckle

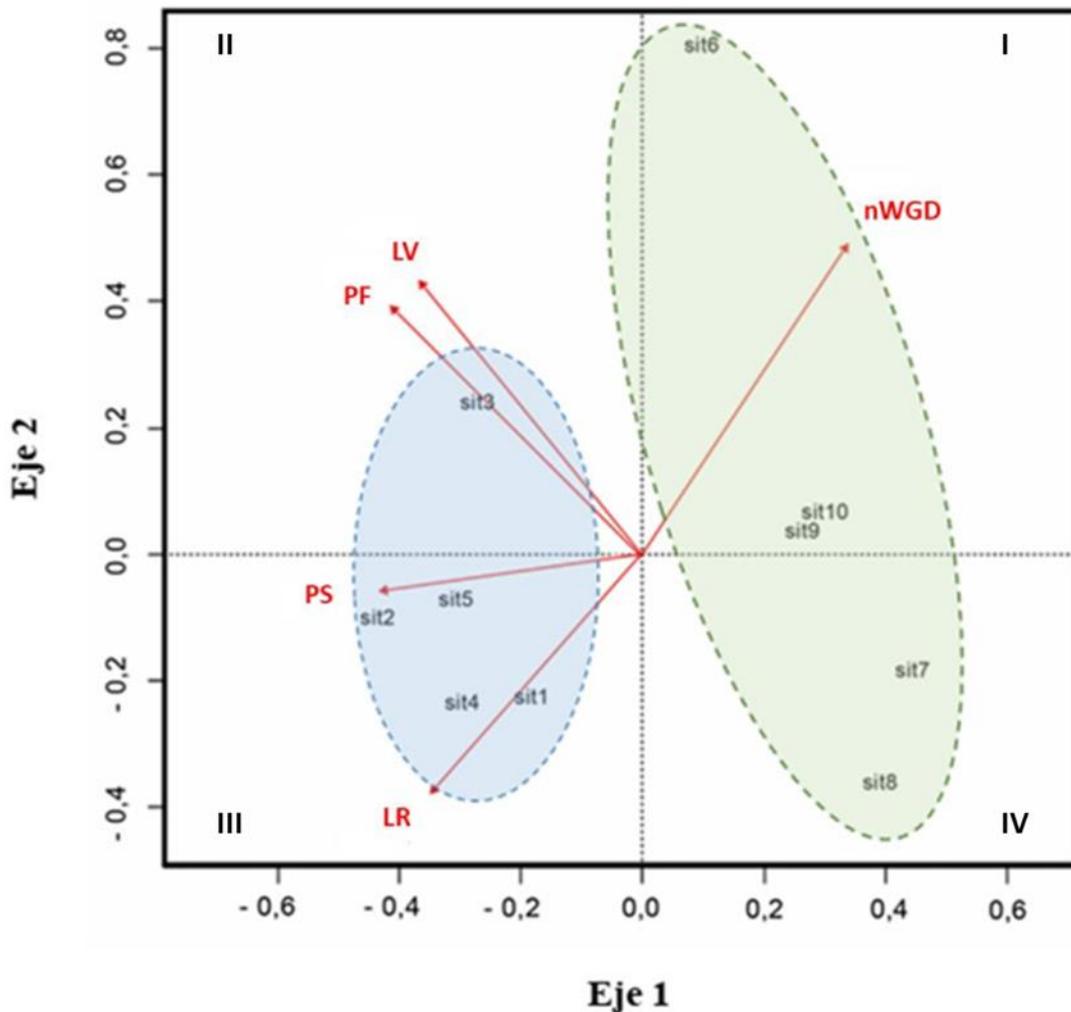


Figura 4.9: Gráfico PCA que muestra la distribución de las plantas (sit) analizadas en dos grupos. El grupo en los cuadrantes II y III (plantas 1 a 5 todas E-) con los valores más altos de PS (peso seco), PF (peso fresco), LR (largo de la raíz) y LV (largo del vástago) y los valores más bajos de nWGD (peso normalizado). diferencias generalizadas ponderadas). El grupo en los cuadrantes I y IV (plantas 6 a 10, todas E+) con los valores más altos de nWGD y los valores más bajos para el resto de las variables.

4.5 Discusión

Teniendo en cuenta que los endofitos juegan un papel importante en la aptitud de las plantas, y que las técnicas tradicionales para estudiarlos son a menudo destructivas, aquí, aplicamos una técnica no invasiva para explorar la actividad de biospeckle láser (LBSA) en las hojas de *Jatropha curcas* colonizadas y no colonizadas por endofitos. Los resultados sugieren que la actividad Biospeckle podría usarse como un buen indicador indirecto de colonización endofítica en las hojas.

En relación a la diversidad de la comunidad endofítica foliar aislada de *Jatropha curcas*, esta se encontró representada por un número limitado de taxones, como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Nigrospora*, todos pertenecientes al phylum Ascomycota, y que ya se informaron previamente como endofitos de este hospedante (Jaiswal & Pandey, 2013; Kumar & Kaushik, 2013)..

Recientemente, se ha utilizado la técnica de biospeckle (LBSA) en diversos campos científicos. Braga Jr. et al. (2007) la emplearon para detectar hongos en porotos, mientras que White et al. (2011) la aplicaron para evaluar la densidad vascular en un modelo de cámara de pliegues cutáneos dorsales en roedores. Zhong et al. (2014) la utilizaron para monitorear el estado del agua en hojas, y Zdunek et al. (2014) revisaron su aplicación en la evaluación de tejidos vegetales, concluyendo que es una herramienta no destructiva de interés en agricultura. En la actualidad, esta técnica se encuentra en desarrollo y tiene potencial en medicina, industria alimenticia y agricultura (Shvartsman & Fine, 2003; Zdunek et al., 2014; Farraro et al., 2016; Tang et al., 2021; Pandiselvam et al., 2020; Singh et al., 2020; Singh et al., 2021; de Castro et al., 2022; Igarashi et al., 2023).

En este estudio, se analizó la presencia de endofitos fúngicos en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de 10 días de edad. Observamos una relación clara entre la carga endofítica y la actividad biospeckle, especialmente en las variables MxF y nWGD. Las hojas con baja colonización endofítica (E-) presentaron valores más bajos de nWGD pero valores más altos de MxF, mientras que las hojas con alta colonización endofítica (E+) mostraron la relación opuesta. El análisis multivariado confirmó que las plantas E+ y E- formaron grupos distintos, donde el PS y LR difirieron significativamente y el PS se correlacionó negativamente con la colonización endofítica.

Las asociaciones planta-hongo, que son ubicuas en las comunidades de plantas, juegan papeles importantes y variados en diferentes aspectos fisiológicos de las plantas (Hyde y Soyong 2008). Los hongos patógenos asociados con las raíces, el tejido vascular y el follaje pueden interferir con la absorción y el transporte de agua, aumentar las tasas de transpiración foliar e inducir la embolia de la xilema y la muerte del tejido (Agrios 1997). Por el contrario, los mutualistas de la rizosfera, como los hongos ecto micorrízicos y arbusculares, pueden beneficiar a los huéspedes al aumentar el área de superficie para la absorción de agua, mejorar la regulación estomática de la pérdida de agua y aumentar la conductividad hidráulica de la raíz (Augé 2001; Lössch y Gansert 2002). Arnold y Engelbrecht (2007) adoptaron un enfoque experimental para demostrar que la colonización de endofitos aumenta la conductancia mínima de la hoja, una medida de la pérdida de agua de la hoja después del cierre estomático máximo bajo estrés por sequía, en el árbol tropical *Theobroma cacao*. Demostraron que, durante el cierre estomático máximo, las hojas infectadas con una densidad y diversidad natural de endofitos exhiben tasas de pérdida de agua de casi el doble en relación con las hojas no infectadas. En contraste, a partir de los estudios revisados por Dastogeer y Wylie (2017), es evidente que la colonización de endofitos puede mejorar significativamente la tolerancia al estrés

por sequía de las plantas. Estos autores sugieren que los hongos no micorrízicos (por ejemplo, los endófitos foliares) pueden mediar los efectos del estrés hídrico ajustando, regulando o modificando las actividades fisiológicas, bioquímicas y metabólicas de las plantas. En este trabajo, no solo las nervaduras de las plantas E+, sino también las láminas de las hojas presentaron mayor actividad de speckle, lo que evidencia una relación entre la carga endofítica y un movimiento más eficiente de agua en las hojas.

Estos resultados ofrecen una contribución interesante a la detección de endofitos fúngicos en plantas mediante el método no invasivo LBSA. Este enfoque nos permite identificar la presencia de endofitos de manera anticipada en las plantas, lo cual es importante debido a la relación simbiótica beneficiosa que los endofitos establecen con la planta hospedante. Su presencia puede influir en la respuesta de la planta ante condiciones ambientales desfavorables, como la sequía. Detectar tempranamente los endofitos nos permite comprender mejor la dinámica planta-endofito y, de esta manera, obtener una visión más completa de la salud y la capacidad de adaptación de las plantas a diferentes condiciones de estrés, incluido el estrés hídrico. Con esta comprensión, podemos tomar medidas preventivas adecuadas. Estas medidas pueden incluir el monitoreo y ajuste de las prácticas de riego, así como la implementación de tratamientos específicos que favorezcan las interacciones simbióticas y promuevan la resistencia de la planta a diversos tipos de estrés. Por lo tanto, resulta de gran interés llevar a cabo nuevas investigaciones que apliquen la técnica de LSBA en diversos cultivos. Por ejemplo, un enfoque interesante es aplicar esta técnica en cultivos inoculados artificialmente con endofitos y micorrizas, simultáneamente (como se realizó en el capítulo 3, en plantas de *Cucumis sativus*), para estudiar desde otro enfoque y de manera no invasiva las relaciones simbióticas establecidas entre estos organismos y la planta hospedante. Esto permitirá validar de manera más precisa los resultados preliminares obtenidos en este estudio. La realización

de estudios adicionales nos brindará una comprensión más completa de los efectos y beneficios de la técnica LSBA en la agricultura y nos ayudará a establecer su viabilidad y aplicabilidad en distintos escenarios.

Capítulo 5

Discusión y Conclusiones generales

5.1 Discusión general

Los estudios presentados en este trabajo destacan la importancia de los endofitos asociados a *Jatropha curcas* y su influencia en el crecimiento, desarrollo y la salud de las plantas hospedantes. Se encontró que la asociación entre los endofitos y su hospedante promueve una mayor colonización micorrícica, lo que mejora la absorción de nutrientes y favorece un crecimiento más robusto de las plantas. Específicamente, se identificó el género *Alternaria* como el endofito más abundante en *Jatropha curcas*.

El acondicionamiento del suelo con *Jatropha curcas*, combinado con su estatus endofítico, tuvo efectos significativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas de segunda generación, independientemente de si eran de la misma especie o diferente. Estos efectos también se reflejaron en los parámetros del suelo y la comunidad de hongos asociados. Además, se observó que la presencia de *Jatropha curcas* como planta de segunda generación favoreció la abundancia de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas, lo que sugiere beneficios para la disponibilidad de nutrientes y la salud de las plantas.

Se encontró que las cepas endofíticas del género *Alternaria* provenientes de hojas de *Jatropha curcas* pueden ser utilizadas como bioinoculantes para mejorar el desarrollo de plántulas de otras especies, como *Cucumis sativus*. Estos hallazgos sugieren la prometedora aplicación de cepas específicas de *Alternaria* como bioinsumos para favorecer el crecimiento de plantas de interés económico.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que, si bien *Jatropha curcas* presenta procesos de retroalimentación positiva, estos procesos no conllevan alteraciones que

impactan en el desarrollo de especies vegetales nativas, por lo que estos aspectos en términos de sustentabilidad no representarían un impacto negativo.

5.2 Conclusiones generales

Según los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que la asociación entre los endofitos de transmisión horizontal y *Jatropha curcas* es la responsable de promover una mayor colonización micorrícica en el hospedante, impactando positivamente en la absorción de nutrientes y en el crecimiento de las plantas hospedantes.

Los resultados obtenidos mostraron que, independientemente de las comunidades del suelo, la asociación planta-endófito es responsable de modular al menos algunos parámetros físico químicos del suelo.

En relación a la diversidad de los endofitos, el género más abundante fue *Alternaria*. Este hallazgo proporciona información relevante sobre la diversidad de los endofitos presentes en *Jatropha curcas* y puede servir como punto de partida para futuras investigaciones sobre la interacción planta-endófito.

Dado que el acondicionamiento de suelos con *Jatropha curcas* tiene efectos positivos y significativos en el desarrollo vegetal de las plantas de segunda generación tanto en plantas de la misma especie como en aquellas de especies diferentes a la planta acondicionadora, se concluye que el acondicionamiento de suelos con *Jatropha curcas* mejora el crecimiento y desarrollo en las plantas de segunda generación.

Además, dado que el acondicionados de suelos con *Jatropha curcas*, junto al estatus endofítico E+ promueve un aumento de pH, y dado que se observó una asociación entre la abundancia de organismos solubilizadores de fósforo y el estatus endofítico E-, se

concluye que el acondicionamiento con *Jatropha curcas* contribuye a la alcalinización del suelo y promueve la presencia de organismos solubilizadores de fósforo en el suelo.

Las plantas de *Jatropha curcas* cultivadas en suelo acondicionado con plantas de la misma especie presentaron un mayor peso seco de vástagos y raíces, lo que indica un crecimiento y desarrollo más robusto. Por esta razón se concluye que *Jatropha curcas* ejerce un efecto de retroalimentación planta–suelo positivo, sobre una segunda generación de plantas de la misma especie que la acondicionadora, independientemente de su estatus endofítico.

La presencia de *Jatropha curcas* como planta de segunda generación, independientemente del estatus endofítico de la planta acondicionadora, favoreció la abundancia de hongos solubilizadores de fósforo y hongos s. Por lo tanto, se concluye que el acondicionamiento del suelo con *Jatropha curcas* influye en la disponibilidad de nutrientes y en la abundancia de microorganismos beneficiosos para las plantas.

Estos resultados tienen implicaciones importantes para comprender los efectos de las asociaciones entre especies exóticas invasoras y sus hongos endofíticos en los ecosistemas y destacan la necesidad de considerar los impactos potenciales antes de utilizar especies exóticas en proyectos de acondicionamiento del suelo o restauración ambiental, sobre todo cuando estas especies tienen un interés económico, como es el caso de *Jatropha curcas*.

Cuando la planta de segunda generación es *Jacaranda mimosifolia*, la abundancia de hongos solubilizadores de P y de hongos rizosféricos está asociada al estatus E+, en particular la formación de asociaciones micorrícicas. A su vez, las plantas de *Jacaranda mimosifolia* mostraron un incremento significativo en el largo, peso fresco y peso seco de

vástagos y raíces cuando crecieron en suelos acondicionados con *Jatropha curcas*. Por lo tanto, se concluye que el acondicionamiento de suelos con *Jatropha curcas* junto a su estatus endofítico E+, beneficia el desarrollo de plantas de segunda generación de una especie diferente a la especie de la planta condicionadora, en particular *Jacaranda mimosifolia*, promoviendo la abundancia de hongos rizosférico, y en particular, las asociaciones micorrícicas.

Para la inoculación de plantas de *Cucumis sativus* se determinó que el método más efectivo fue mediante la aspersion de una suspensión de conidios en condiciones de alta humedad. La cepa C2 correspondiente a *Alternaria* (KR780620), aislada de *Jatropha curcas*, demostró ser un bioinoculante eficaz en plantas de *Cucumis sativus*, mejorando el desarrollo y crecimiento de las mismas, en particular, el peso fresco y el peso seco de las raíces. Las plantas de *Cucumis sativus* inoculadas con la cepa endofítica C2 de *Alternaria* presentaron una mayor colonización micorrícica en comparación con las plantas no inoculadas. Se concluye entonces que la cepa endofítica C2 de *Alternaria*, proveniente de hojas de *Jatropha curcas*, puede ser utilizada como bioinoculante fúngico para mejorar el desarrollo y la micorrización de plantas de diferentes especies, e interés económico, como *Cucumis sativus*.

La técnica de biospeckle láser (LBSA) resultó ser un eficaz indicador no invasivo de la colonización endofítica en las hojas de *Jatropha curcas*, brindando así nuevas perspectivas para una mejor comprensión de las interacciones planta-endofito.

En síntesis, los resultados de este trabajo resaltan el impacto de las interacciones entre hongos endofíticos y plantas exóticas invasoras en los ecosistemas nativos. El estudio de estas interacciones es crucial para comprender los efectos ecológicos y agronómicos de

las especies invasoras, especialmente cuando se trata de plantas exóticas con un interés económico, como en el caso de *Jatropha curcas*. A su vez, tiene implicaciones significativas en la conservación de la biodiversidad y en la adopción de prácticas sostenibles, con la incorporación de técnicas no invasivas. Mediante la comprensión de estos procesos, se pueden desarrollar estrategias más efectivas para mitigar los impactos negativos de las especies invasoras y promover la conservación de los ecosistemas nativos.



Lic. María Fernanda D'Jonsiles



Dra. Cecilia Cristina Carmarán



Dra. María Victoria Novas

ANEXO

Anexo fotográfico del capítulo 1

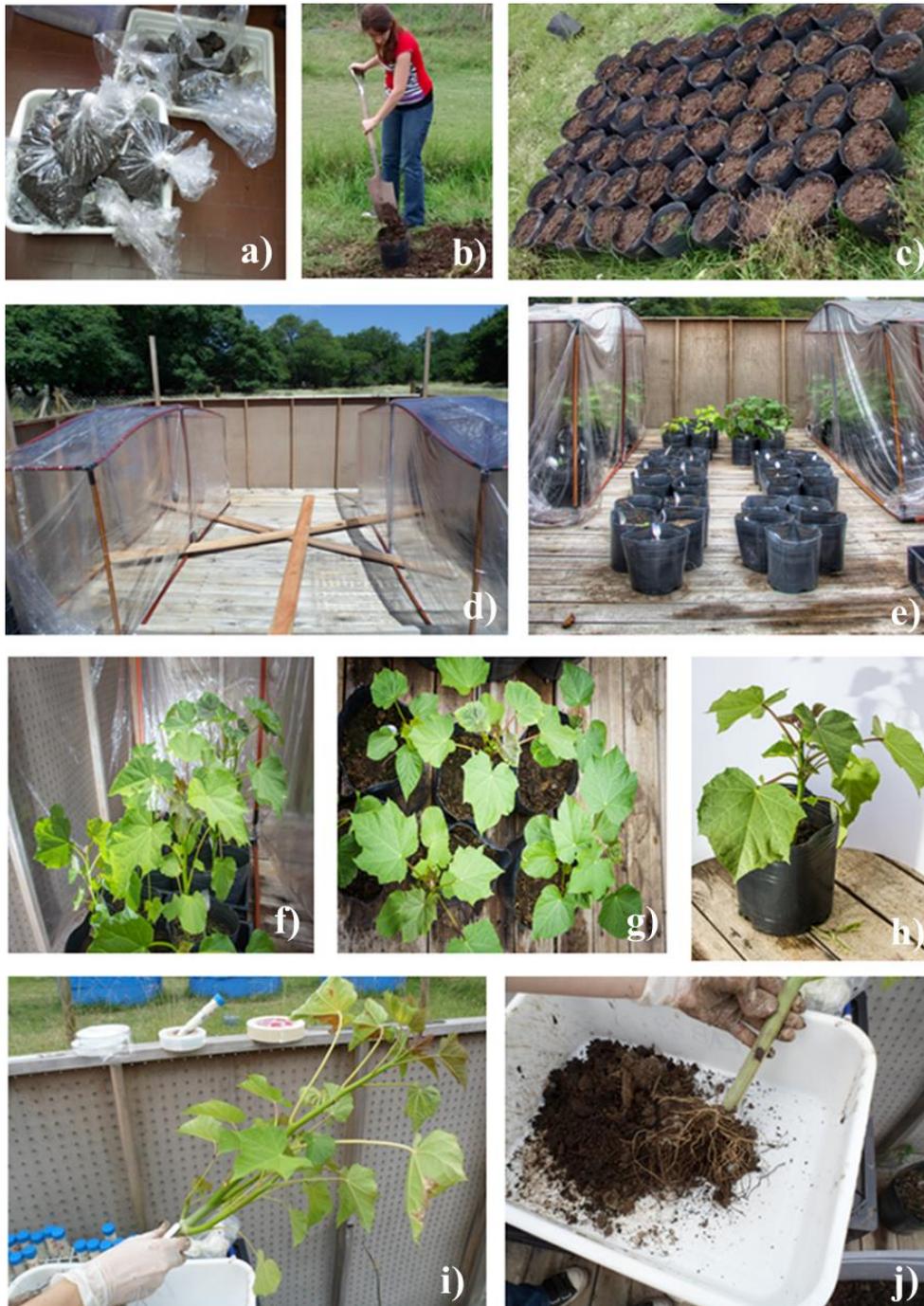


Figura 1: Bolsas con suelo tinalizado (a). Preparación de las macetas utilizadas en los ensayos del capítulo 1 (b y c). Espacio destinado a la realización de los ensayos. Se observan las estructuras con plástico cristal utilizadas para obtener plantas E- (d). Plantas de *Jatropha curcas* L. en proceso de crecimiento bajo las diferentes condiciones (E+/E-) (e). Plantas E- (f). Plantas E+ (g). Proceso de extracción de las plantas, suelo rizosférico, y muestras de raíces para su posterior análisis en laboratorio (i, j).

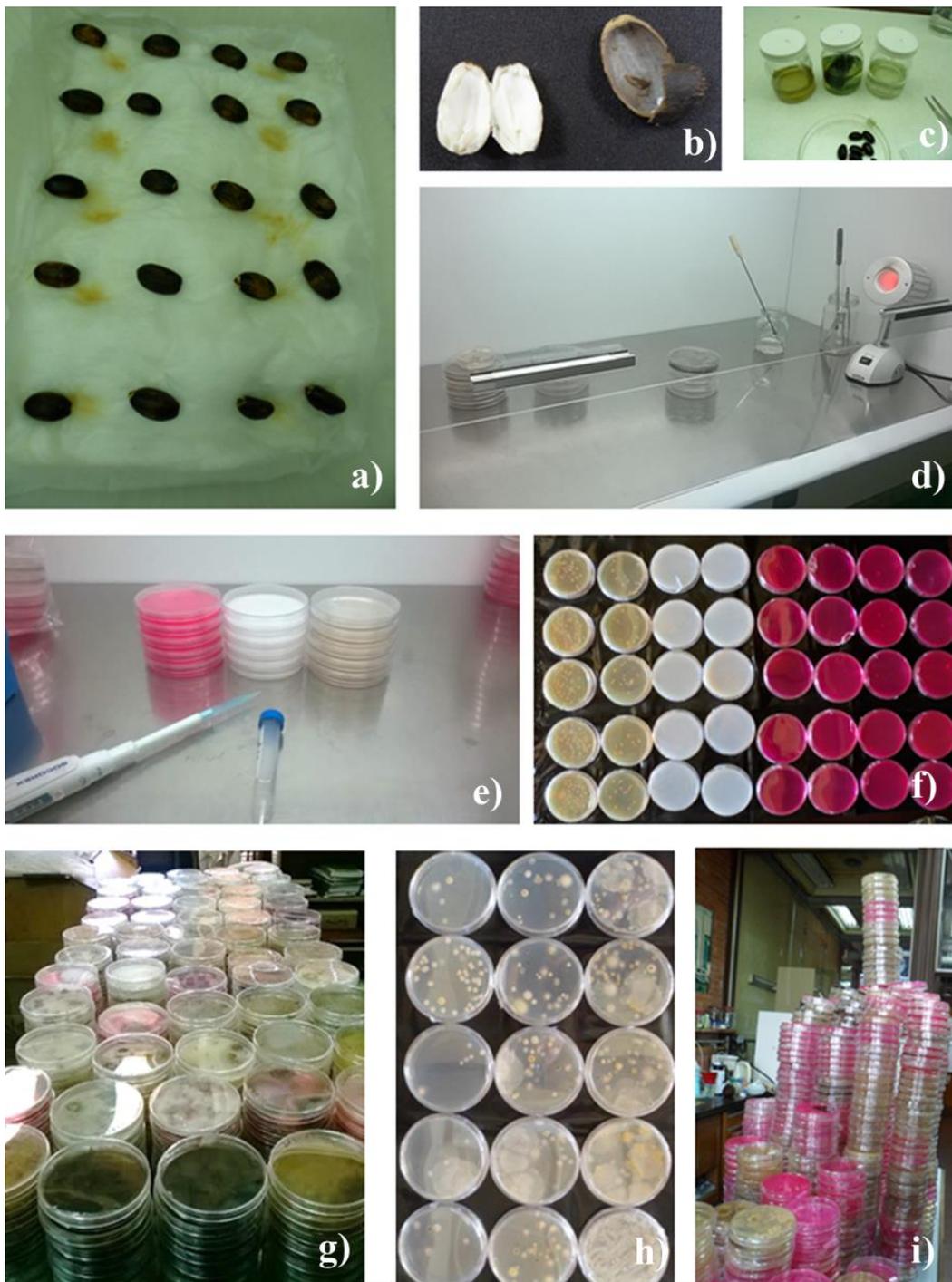


Figura 2: Ensayos de germinación de semillas de *Jatropha curcas* L. (a). Semilla de *Jatropha curcas* con su cubierta seminal separada del resto (b). Método de esterilización superficial de las semillas para su posterior análisis (c). Trabajo en flujo laminar (d). Diferentes medios de cultivos utilizados en los análisis de hongos de suelo (e y f). Cultivos de hongos de suelo en diferentes medios de cultivo (g, h e i).

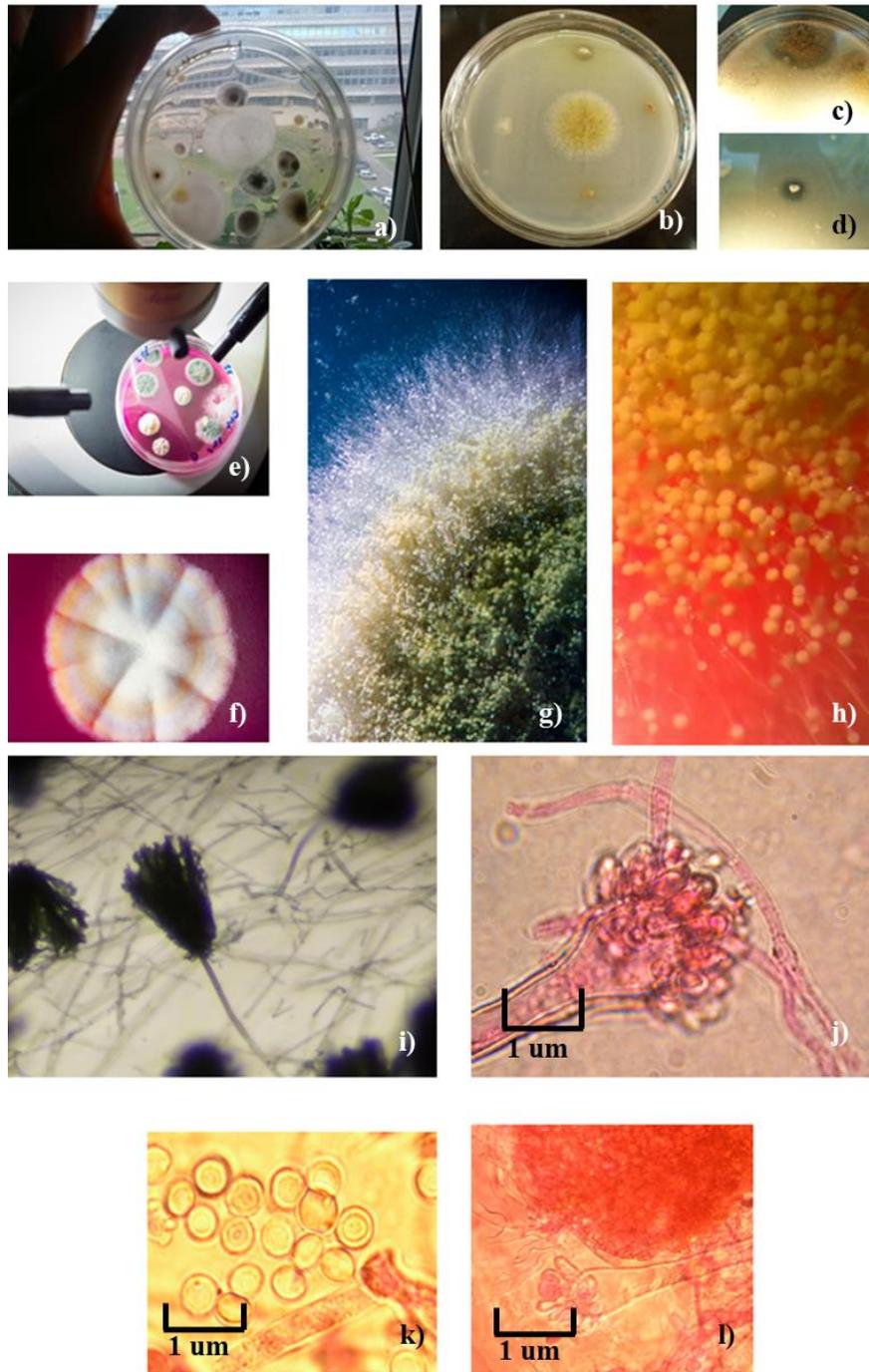


Figura 3: Diferentes colonias de hongos de suelo creciendo en una placa de Petri con medio MEACh (a). Colonias de hongos creciendo en NBRIP, donde se puede observar un halo de solubilización de fósforo alrededor de algunas colonias (b, c y d). Colonias creciendo en medio DRBC (e). Colonias de *Aspergillus* observadas con lupa (10 x y 20 x) (f y g). Colonia de *Penicillium* creciendo en DRBC (h). Conidióforo de *Penicillium* observado en microscopio óptico pero sin montaje (40 x), por lo que se observa la sombra del mismo (i). Conidióforos y conidios de *Aspergillus* observados en microscopio (1000 x) (j, k y l).

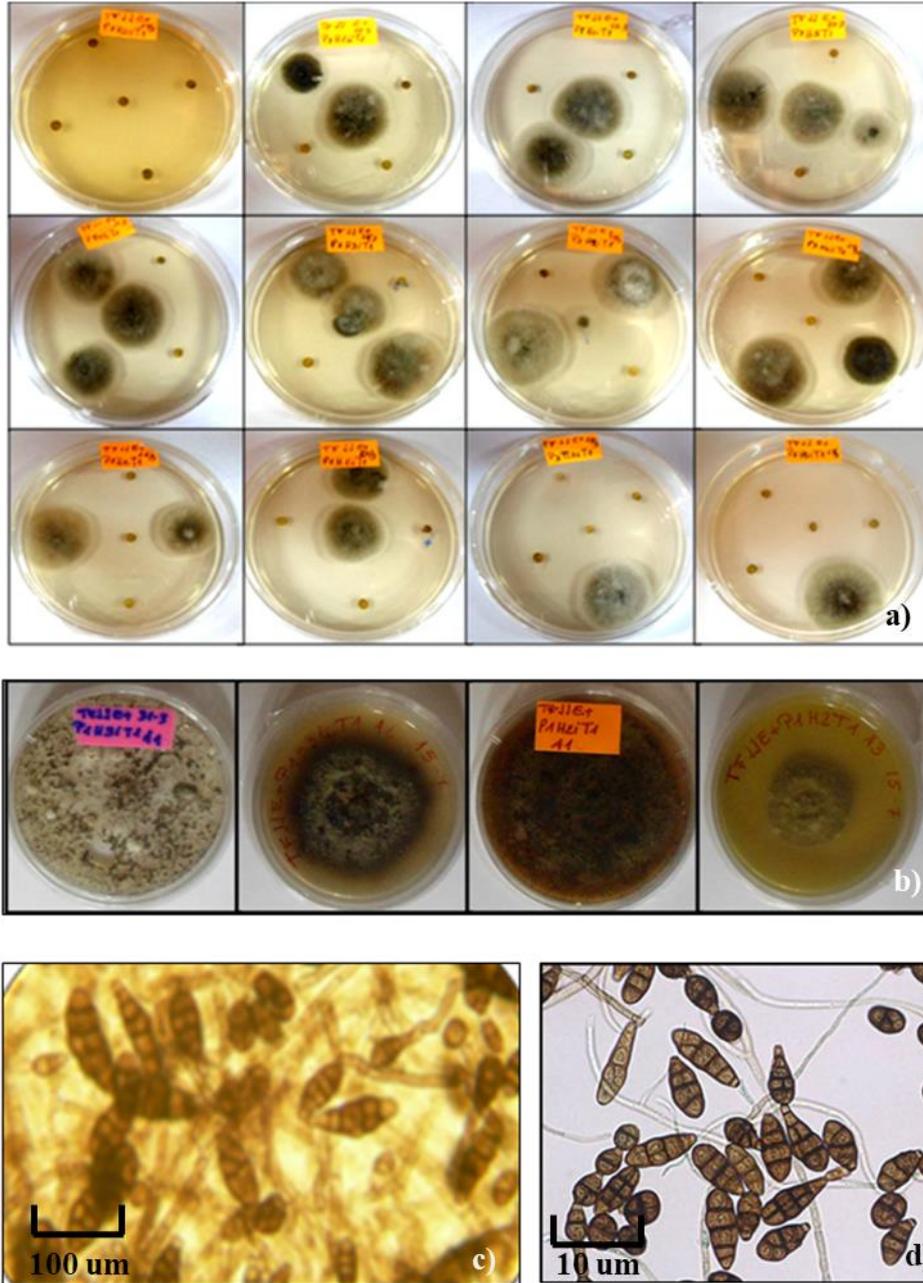


Figura 3: Fragmentos de hojas de *Jatropha curcas* colonizados por endofitos (a). Cultivos axénicos a partir de los fragmentos colonizados (b). Conidios de *Alternaria* (c y d).

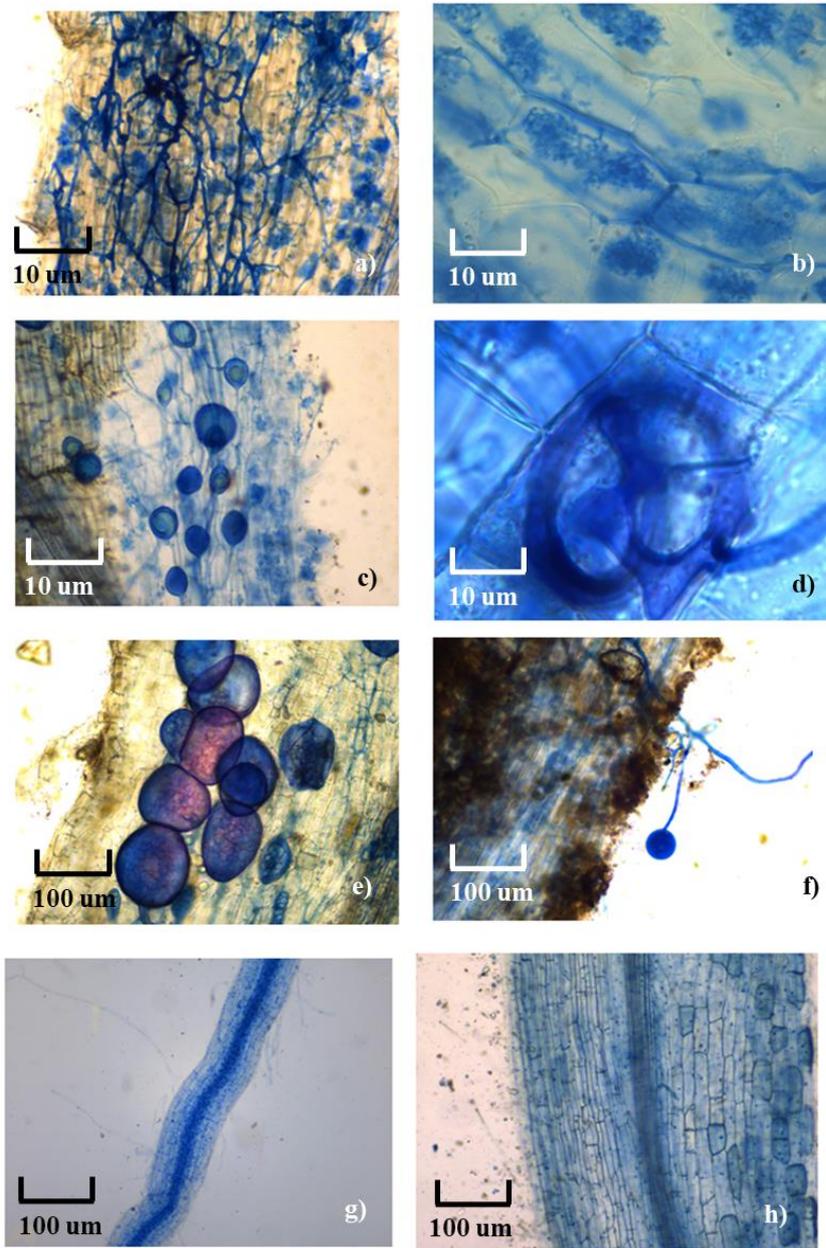


Figura 4: Raíces de *Jatropha curcas* colonizadas por hongos micorrícicos (a, b, c, d, e y f). Gracias a la tinción con Trypan Blue se pueden observar las diferentes estructuras: hifas y arbusculos (a), arbusculos (b), vesículas (c y e), coil(d). Se puede observar una espora en la imagen f). Las imágenes g) y h) no presentan colonización micorrícica.

Anexo fotográfico del capítulo 2

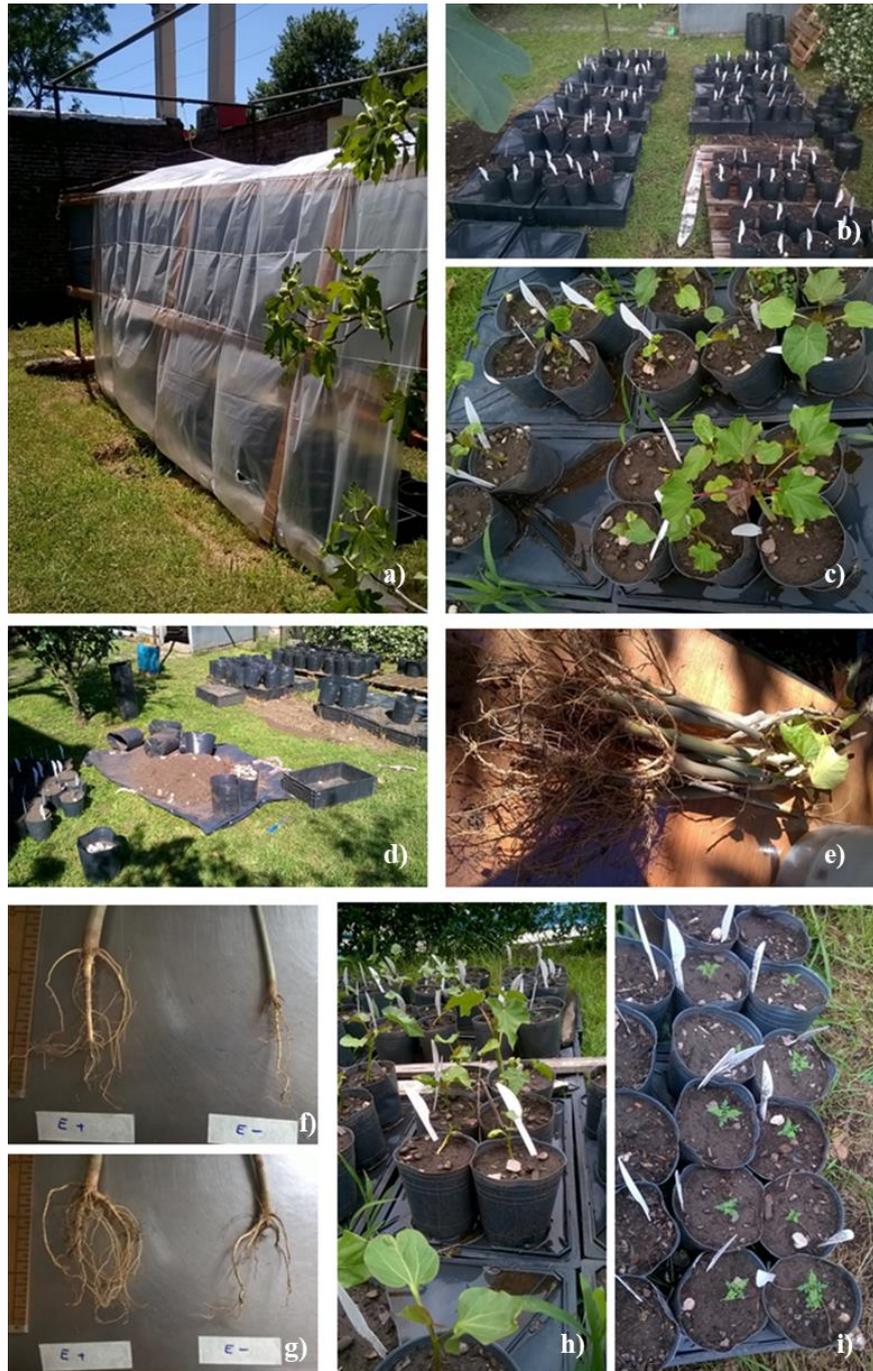


Figura 1: Invernadero armado para establecer el estatus endofítico E- en T0 (a). Plantas de *Jatropha curcas*, en la fase de acondicionamiento J+E+ (b y c). Preparación de las macetas para el establecimiento de las plantas de segunda generación, y preparación de suelo para su análisis químico (d). Plantas de *Jatropha curcas*, extraídas luego de la fase de acondicionamiento para su análisis en laboratorio (e). Comparación de raíces E+ y E- de plantas de *Jatropha curcas* luego de la fase de acondicionamiento (f y g). Plantas de *Jatropha curcas* y *Jacaranda mimosifolia* creciendo en macetas previamente acondicionadas.

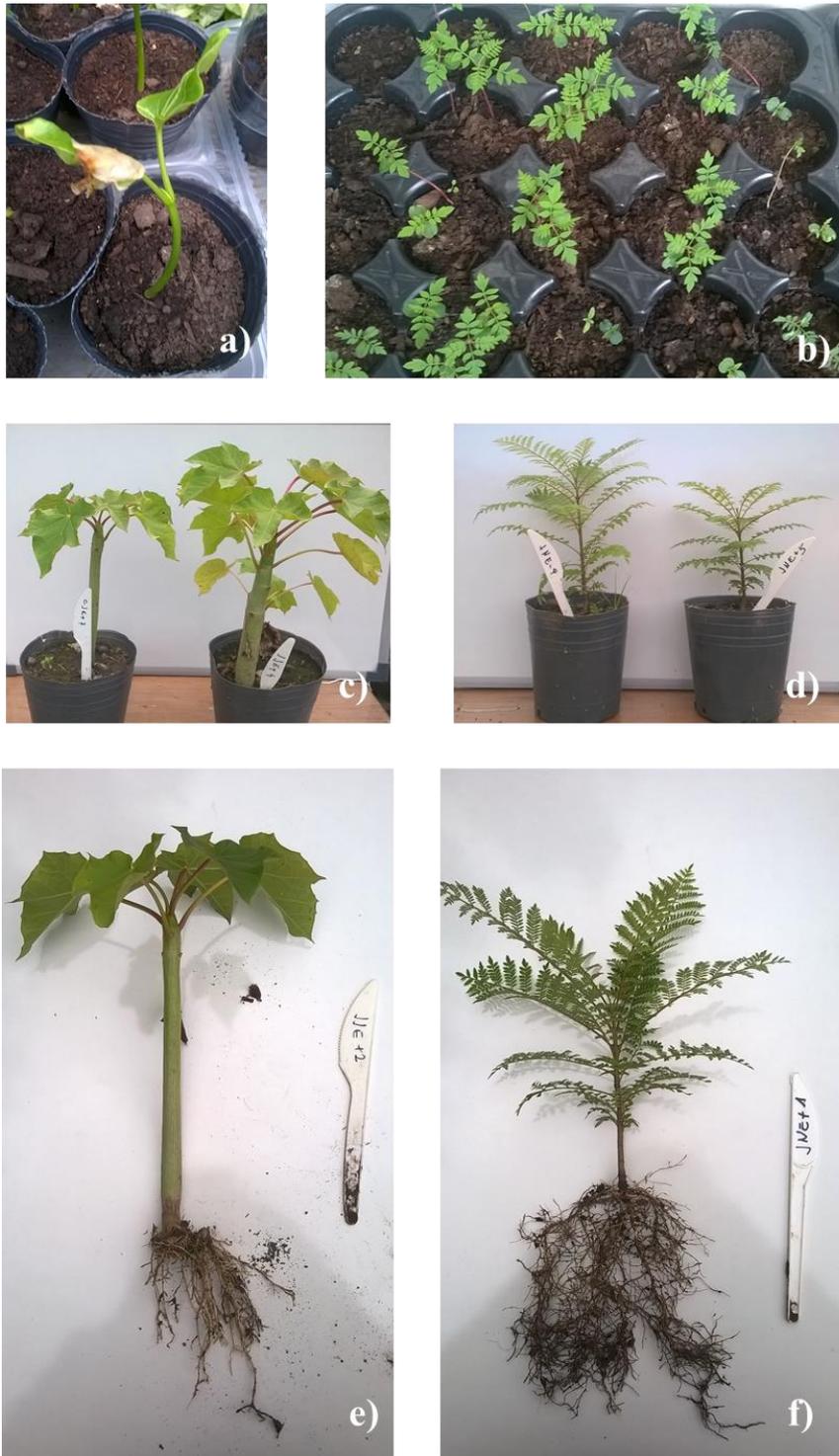


Figura 2: Plántulas de *Jatropha curcas* (a) y *Jacaranda mimosifolia* (b) durante la fase respuesta. Plantas de *Jatropha curcas* y *J. mimosifolia* al finalizar la fase respuesta, T2 (c y d), y su preparación para el análisis en laboratorio (e y f).

Anexo fotográfico del capítulo 3



Figura 1: Plántulas de *Cucumis sativus* previo a los ensayos de inoculación de endofitos y micorrizas (a, b y c). Plántulas recién inoculadas, dentro de un recipiente contenedor, y luego trasladadas al invernadero en condiciones de alta humedad para favorecer la colonización endofítica (d y e). Plántulas previo a la inoculación con micorrizas (f). Sustrato conteniendo esporas de *Gigaspora rosea* (g). Método de inoculación de micorrizas (h).

Anexo fotográfico de capítulo 4

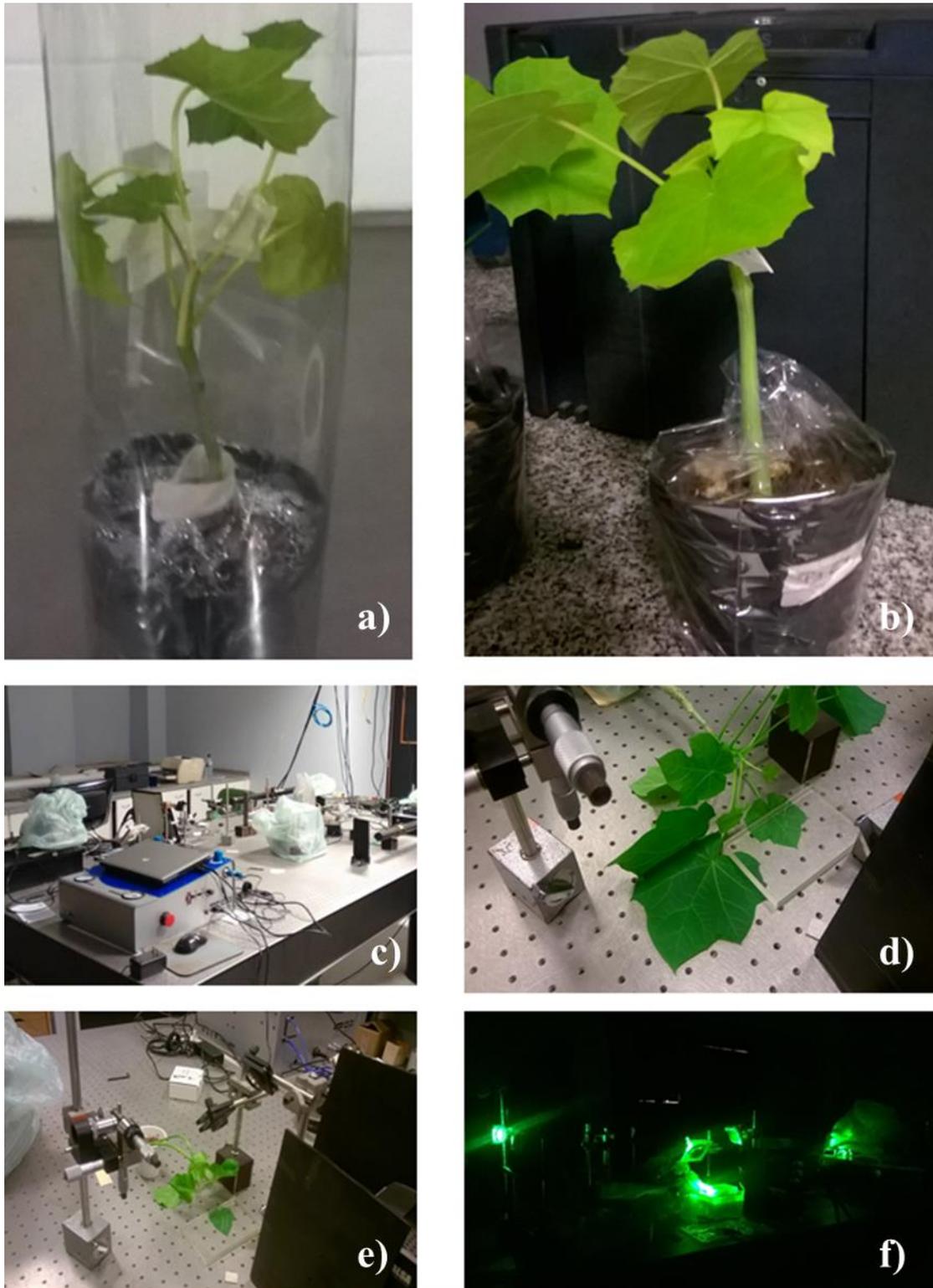


Figura 1: Plantas de *Jatropha curcas* E- (a) y E+ (b), previo a las mediciones de LSBA (Laser Biospeckle Activity). Banco óptico con el set up preparado para las mediciones (c). Hoja de *J. curca* lista para la medición, inmovilizada sobre la mesa (d y e). Momento en que se realiza una medición de LSBA. Se puede observar el láser verde utilizado en esta técnica (f)

Anexo estadístico y filogenético del capítulo 1

Tabla 1. Secuencias utilizadas en el estudio filogenético, sus números de acceso al número de espécimen y país de origen. Las secuencias fueron utilizadas para las reconstrucciones filogenéticas de los capítulos 1 y 3.

Especies	Número de acceso al Genbank	Especímen/cepa/ No.	País	Referencias
<i>Alternaria alternata</i>	AF347031	CBS 916.96*	India	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria alternata</i>	FJ827039	Isolate R1-1	China	Li (2009)**
<i>Alternaria alternata</i>	JF835809	isolate 4h	China	Yang and Qu (2011)**
<i>Alternaria alternata</i>	JQ907485	Isolate AA-13	India	Kandan et al.(2012)**
<i>Alternaria alternata</i>	JX406572	CSS11671	China	Tang et al. (2012)**
<i>Alternaria alternata</i>	JX406532	CSS11766	China	Tang et al. (2012)**
<i>Alternaria alternata</i>	KF293886	P23-J	China	Sun and Yan(2013)**
<i>Alternaria alternata</i>	KJ739876	TAS 2-1	Turquía	Savas and Yildiz (2014)**
<i>Alternaria arborescens</i>	AF347033	CBS 102605*	U.S.A.	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria brassicae</i>	JF439450	aislamiento W3	India	Sharma et al. (2011)**
<i>Alternaria brassicicola</i>	KF542549	Ab1H	India	Bag et al. (2013)**
<i>Alternaria daucifolii</i>	KC584193	CBS 118812*	U.S.A.	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria gaisen</i>	KC584197	CBS 632.93	Japón	Woudenberg et al. (2013)

<i>Alternaria infectoria</i>	DQ323697	CBS 210.86*	UK	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria pseudorostrata</i>	JN383483	CBS 119411*	U.S.A.	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria quercus</i>	JX418349	A28	China	Li, Y (2012)**
<i>Alternaria solani</i>	JX406567	CS11679	China	Tang et al. (2012)**
<i>Alternaria solani</i>	KC584217	CBS 116651	U.S.A.	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria tenuissima</i>	KC329619	SX6	China	Luo (2012)**
<i>Alternaria tenuissima</i>	KP101215	AV2P16-1	China	Cao (2014)**
<i>Alternaria tenuissima</i>	AY751455	EGS34-015	China	Xue and Zhanget al. (2005)
<i>Alternaria tenuissima</i>	AF347032	CBS 918.96	UK	Woudenberg et al. (2013)
<i>Alternaria tenuissima</i>	HG798778	TUAt39	Arabia Saudita	Gherbawy (2014)**
<i>Alternaria tenuissima</i>	HM051071	isolate wxm160	China	Wu and Song (2010)**
<i>Aspergillus echinulatus</i>	EF652060	NRRL 131	--	Peterson (2008)
<i>Aspergillus glaucus</i>	EF652051	NRRL 114	--	Peterson (2008)
<i>Aspergillus medius.</i>	EF652056	NRRL 124	--	Peterson (2008)
<i>Aspergillus niveoglaucus</i>	HE578069	F-530	Costa Rica	Hubka et al. (2013)
<i>Aspergillus proliferans</i>	HE615128	CCF 4192	España	Hubka et al. (2013)
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	EF652048	NRRL 13	--	Peterson (2008)
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	EF652049	NRRL 17	--	Peterson (2008)

<i>Aspergillus umbrosus</i>	EF652055	NRRL 121	--	Peterson (2008)
<i>Bipolaris coffeana</i>	HE792943	CBS 126976	--	Da Cunha et al. (2012)
<i>Bipolaris coffeana</i>	KM230387	MUS003	U.S.A.	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris cynodontis</i>	KP068719	WM 13.307	--	Irinyi et al. (2014)**
<i>Bipolaris cynodontis</i>	KJ909767	CBS 109894	Hungría	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris drechsleri</i>	KF500530	CBS 136207	U.S.A.	Crous et al. (2013b)
<i>Bipolaris microstegii</i>	JX089579	CBS 132550	U.S.A.	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris oryzae</i>	JX256416	MFLUCC 100715	Thailandia	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris salviniae</i>	KJ922390	IMI 228224	Brasil	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris secalis</i>	KJ415537	BRIP 14453	Argentina	Tan et al. (2014)
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KJ922381	CBS 110.14	U.S.A.	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris victoriae</i>	KJ909778	CBS 327.64	U.S.A.	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bipolaris yamadae</i>	KJ909779	CBS 202.29	Japón	Manamgoda et al. (2014)
<i>Bjerkandera adusta.</i>	AY089741	BOS 55	--	Adair et al. (2003)
<i>Candida krabiensis</i>	NR111359	ATCC 4469*	--	Suh and Zhou (2014)**
<i>Candida nitratophila</i>	JX965188	CBS 2027	U.S.A.	Limtong et al. (2013)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AY251070	ATCC 66669	U.S.A.	Braun et al. (2003)

<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AY251073	CBS 109.21	UK	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AY251074	CBS 401.80	Países Bajos	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium oxysporum</i>	AF393720	ATCC 76499	U.S.A.	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium oxysporum</i>	AJ300332	CBS 125.80	Netherlands	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AY251077	ATCC 11290	--	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AF393724	ATCC 38027	Nueva Caledonia	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium uredinicola</i>	AY251071	ATCC 46649	U.S.A.	Braun et al. (2003)
<i>Cladosporium herbarum</i>	AF393705	ATCC 201090	U.S.A.	Braun et al. (2003)
<i>Colletotrichum beeveri</i>	JQ005171	ICMP 18594*	Nueva Zelanda	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ005153	MAFF 305972*	Japón	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ005155	MAFF 306162	Japón	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum brasiliense</i>	JQ005235	PAS12*	Brasil	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	JQ005152	CBS 112999	Italia	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ005220	CBS 106.91	Brasil	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum oncidii</i>	JQ005169	CBS 129828*	Alemania	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum petchii</i>	JQ005223	CBS 378.94*	Italy	Damm et al. (2012)
<i>Conoplea fusca</i>	EU552114	CBS 113475	South Africa	Marincowitz et al. (2008)

<i>Coprinellus radians</i>	FJ462761	T43	China	Zhang et al. (2008)**
<i>Coprinellus xanthothrix</i>	AB693907	isolate F0721	Japón	He et al. (2012)
<i>Coprinellus xanthothrix</i>	KJ028784	NEFU33	--	Zhao (2013)**
<i>Cordyceps confragosa</i>	JQ387577	isolate LeLe2	Irán	Jamali and Banihashemi (2012)**
<i>Cyphella digitalis</i>	DQ486698	CBS 679.82	--	Matheny et al. (2006)
<i>Dipodascus tetrasporeus</i>	AB300502	CBS 10071	Japón	Nagahama et al. (2008)
<i>Epicoccum nigrum</i>	KC215136	YN-AS-1	China	Qiao (2013)**
<i>Epicoccum nigrum</i>	KM977751	TGF1-MRL	Pakistán	Nadeem et al. (2014)**
<i>Epicoccum nigrum</i>	KJ589556	FKF2	China	Wang (2014)**
<i>Fusarium solani.</i>	KC254050	ISHAM MITS1879	Grecia	Arabatzis and Velegraki (2012)**
<i>Fusarium solani</i>	EU263916	strain 0114	China	Liu and Bao (2009)
<i>Galactomyces candidum</i>	JN974288	CBS 557.83	Países Bajos	Groenewald et al. (2012)
<i>Geotrichum candidum</i>	KF713519	L19PD	España	Marín et al. (2014)
<i>Graphium penicillioides</i>	KJ780752	A1S2-D48	--	Teh and Latiffah (2014)**
<i>Guignardia citricarpa</i>	JN979725	CBS 557.83	Países Bajos	Miles et al. (2013)
<i>Guignardia citricarpa</i>	JN979736	BRIP 53719	Australia	Miles (2011)**
<i>Guignardia mangiferae</i>	EU821361	isolate phy06	China	Xu et al. (2009)**

<i>Gyoerffyella tricapillata</i>	KC834059	CBS 451.64	U.K.	Baschien et al. (2013)
<i>Haplographium catenatum.</i>	FJ839622	CBS 739.68	Países Bajos	Crous et al. (2009a)
<i>Hymenochaete spreta</i>	AY558597	CBS 213.91	Canadá	Jeong et al. (2005)
<i>Hyphodiscus hymeniophilus</i>	GU727555	CBS 529.87	Alemania	Bogale et al. (2010)
<i>Inonotus tenuicontextus</i>	JN169786	IFP:Yuan 5526	China	Zhou and Qin (2012)
<i>Nigrospora oryzae</i>	KC771472	CEQCA-M1190	Ecuador	Barba et al. (2013)**
<i>Nigrospora oryzae</i>	GQ221861	NRRL 47510	U.S.A.	Wicklow and Poling (2009)
<i>Nigrospora oryzae</i>	DQ219433	CBS 113884	--	Widmer et al. (2006)
<i>Nigrospora oryzae</i>	KF516962	F12-F	China	Wu et al. (2014)
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.)	KC519729	LH-2	China	Zhai et al. (2013)
<i>Nigrospora sphaerica</i>	JF738028	ZJW-1	China	Zhang et al. (2011)
<i>Peyronellaea pinodella</i>	AB369504	QL85-1	China	Tian (2007)
<i>Paecilomyces marquandii</i>	JQ846086	isolate 6527	China	Murphy et al. (2012)
<i>Peyronellaea_arachidicola</i>	KF679754	isolate BR2	España	Marin and Palmero (2012)**
<i>Peyronellaea arachidicola</i>	JX898682	--	China	Yang (2012)**
<i>Peyronellaea pinodella</i>	EU167565	CBS 110.32	Alemania	Simon et al. (2009)
<i>Pichia</i> sp.	EU117202	CBS 10646	--	Ji and Bai (2008)

<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	AY219344	BKM-F-1767	Russia	de Koker et al. (2003)
<i>Phialea strobilina</i>	EF596821	CBS 643.85	Norway	Ihrmark and Lindahl (2007)**
<i>Phoma pinodella</i>	FN394689	isolate 2815	Spain	Sánchez Marquez et al. (2010)
<i>Phoma pinodella</i>	AY831556	WAC 7978	Australia	Ellwood et al. (2006)
<i>Phoma pinodella</i>	AY831562	CBS 318.90	Australia	Ellwood et al. (2006)
<i>Phyllosticta bifrenariae</i>	JF343565	CBS 128855	Brasil	Wikee et al. (2013)
<i>Phyllosticta brazilianiae</i>	JF343572	CBS 126270	Brasil	Wikee et al. (2013)
<i>Phyllosticta capitalensis.</i>	KM203610	MJ43	India	Mishra et al. (2014)**
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	KF206185	CPC 16590	Argentina	Wikee et al. (2013)
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	KM520030	isolate 2815	España	Sánchez Marquez et al. (2010)
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	FJ538339	CBS 117118	Indonesia	Wulandari et al. (2009)
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	FJ538340	CBS 119720	U.S.A.	Wulandari et al. (2009)
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	JN979725	BRIP 27888	Australia	Miles et al. (2013)
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	JN979736	BRIP 53719	Australia	Miles et al. (2013)
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	JX122971	DAR81851	Australia	Miles et al. (2013)
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	KF170293	CPC 16586	Argentina	Wikee et al. (2013)

<i>Phyllosticta sphaeropsoides</i>	AY042934	CBS 756.70	Alemania	Wikee et al. (2013)
<i>Phyllosticta spinarum</i>	JF343585	CBS 292.90	Francia	Wikee et al. (2013)
<i>Pseudocercospora atromarginalis</i>	GU214671	CPC 11372	Corea del Sur	Crous et al. (2009b)
<i>Pseudocercospora casuarinae</i>	HQ599603	CBS 128218	Australia	Crous et al. (2010)
<i>Pseudocercospora chengtuensis</i>	GU214672	CPC 10785	Corea del Sur	Crous et al. (2009b)
<i>Pseudocercospora elaeodendri</i>	HQ328000	MJ06	--	Huang et al. (2011)
<i>Pseudocercospora elaeodendri</i>	KC172073	kSX2621025	--	Lyu (2012)**
<i>Pseudocercospora fori</i>	GU269806	CPC 14880	Sudáfrica	Crous et al. (2013a)
<i>Pseudocercospora fumígena</i>	GU214675	CPC 12296	Thailandia	Crous et al. (2009b)
<i>Pseudocercospora fuligena</i>	KF881898	CIMAP: Ws-72010	India	Saroj et al. (2014)
<i>Pseudocercospora ginkgoana</i>	JX134048	R. K. 3563 (TNM)	Taiwan	Kirschner and Okuda (2013)
<i>Pseudocercospora jahnii</i>	KM393283	CPC 24235	Filipinas	Acabal et al. (2014)
<i>Pseudocercospora jussiaeae-repentis</i>	KJ201937	TNM 3793	Taiwan	Kirschner and Liu (2014)
<i>Pseudocercospora marginalis</i>	KC172077	w4SX3441025	--	Lyu (2012)**
<i>Pseudocercospora paraguayensis</i>	JQ324978	CBS 111317	Brasil	Crous et al. (2013a)
<i>Pseudocercospora paraguayensis</i>	DQ267602	CBS 111286	Brasil	Hunter et al. (2006)
<i>Pseudocercospora punctata</i>	EU167582	CBS 113315	Sudáfrica	Simon et al. (2009)

<i>Pseudocercospora ravenalicola</i>	GU269810	CBS 122468	India	Crous et al. (2013a)
<i>Trichoderma harzianum</i>	AF057606	CBS 226.95	U.K.	Ospina-Giraldo (1999)
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	X93974	CBS 886.72	Sudáfrica	Kuhls (1996)**
<i>Tricharina groenlandica</i>	JQ824125	CBS 237.85	Groenlandia	Stielow et al. (2013)
<i>Trichurus sp.</i>	JF429669	EMA-2011l	Australia	Adetutu et al. (2011)
<i>Trichurus sp.</i>	JF429670	EMA-2011m	Australia	Adetutu et al. (2011)
<i>Trichurus sp.</i>	JF429673	EMA-2011p	Australia	Adetutu et al. (2011)

(*) indica espécimen tipo, (**) indica paper no publicado. ATCC: American Type Culture Collection, Rockville (USA). BRIP: Plant Pathology Herbarium, Department of Primary Industries, Queensland, Australia. CBS: Centraalbureau, Schimmelcultures (Netherlands). CIMAP: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, India. CCF: Culture Collection of Fungi, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic. CPC: working collection of Pedro Crous. DAR: Plant Pathology Herbarium, Orange Agricultural Institute, Orange, New South Wales, Australia. ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand. IFP: Herbarium, Botany Department, Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang, Liaoning, People's Republic of China. IMI: International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Boreham Lane, United Kingdom. MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Ibaraki, Japan. MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand. MULC: Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (Belgium). MUS: Isolate housed in Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland. NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, Illinois. TNM: Department of Botany, National Museum of Natural Science, Taiwan

Análisis de Biomasa y parámetros de crecimiento vegetal

Tabla de valores

Peso Fresco Vástago (PFV)

```
lm(formula = PFV ~ suelo * endof, data = creccap1)
```

```
ANOVA <- aov(PFV.model1)
```

```
summary(ANOVA)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
suelo   1 37730  37730 41.697 7.92B06 ***
endof   1  9443   9443 10.436 0.00523 **
suelo:endof 1  31    31  0.034 0.85651
Residuals 16 14478   905
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

```
# A tibble: 8 x 9
```

```
  term      group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high  p.adj p.adj.signif
* <chr> <chr> <chr> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 suelo   A   B         0  86.9  58.3  115. 0.00000792 *****
2 endof   A   B         0  43.5  14.9   72.0 0.00523 **
3 suelo:endof A:A B:A         0  89.3  34.9  144. 0.00125 **
4 suelo:endof A:A A:B         0  45.9 -8.50  100. 0.114 ns
5 suelo:endof A:A B:B         0  130.  75.9  185. 0.0000212 *****
6 suelo:endof B:A A:B         0 -43.4 -97.8   11.0 0.144 ns
7 suelo:endof B:A B:B         0  41.0 -13.4   95.4 0.178 ns
8 suelo:endof A:B B:B         0  84.4  30.0  139. 0.00211 **
```

Peso seco vástago (PSV)

```
PSV.model1 <- lm(PSV ~ suelo * endof, data = creccap1)
```

```
ANOVA <- aov(PSV.model1)
```

```
summary(ANOVA)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
suelo   1  963.4  963.4 30.719 4.46B05 ***
endof   1   51.0   51.0  1.625  0.221
suelo:endof 1  84.5   84.5  2.694  0.120
Residuals 16 501.8   31.4
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

```
# A tibble: 3 x 9
```

```
  term      group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high  p.adj p.adj.signif
* <chr> <chr> <chr> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 suelo   A   B         0  13.9  8.57  19.2 0.0000446 *****
2 endof   A   B         0  3.19 -2.12  8.50 0.221 ns
3 suelo:endof A:A B:A         0  18.0  7.86  28.1 0.000582 ***
```

4 suelo:endof A:A	A:B	0	7.30	-2.83	17.4	0.207	ns
5 suelo:endof A:A	B:B	0	17.1	6.94	27.2	0.000974	***
6 suelo:endof B:A	A:B	0	-10.7	-20.8	-0.555	0.0369	*
7 suelo:endof B:A	B:B	0	-0.918	-11.1	9.22	0.994	ns
8 suelo:endof A:B	B:B	0	9.77	-0.363	19.9	0.0608	ns

Peso fresco raíces (PFR)

```
PFR.modelo1 <- lm(PFR ~ suelo * endof, data = creccap1)
```

```
ANOVA <- aov(PFR.modelo1)
```

```
summary(ANOVA)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
suelo	1	258.05	258.05	13.094	0.00231 **
endof	1	6.96	6.96	0.353	0.56058
suelo:endof	1	190.71	190.71	9.677	0.00673 **
Residuals	16	315.32	19.71		

```
---
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

```
# A tibble: 8 x 9
```

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 suelo	A	B	0	7.18	2.98	11.4	0.00231	**
2 endof	A	B	0	1.18	-3.03	5.39	0.561	ns
3 suelo:endof A:A	B:A		0	13.4	5.33	21.4	0.0011	**
4 suelo:endof A:A	A:B		0	7.36	-0.677	15.4	0.0787	ns
5 suelo:endof A:A	B:B		0	8.36	0.331	16.4	0.0398	*
6 suelo:endof B:A	A:B		0	-6.00	-14.0	2.03	0.183	ns
7 suelo:endof B:A	B:B		0	-5.00	-13.0	3.04	0.318	ns
8 suelo:endof A:B	B:B		0	1.01	-7.02	9.04	0.984	ns

Peso seco raíces (PSR)

```
PSR.modelo1 <- lm(PSR ~ suelo * endof, data = creccap1)
```

```
ANOVA <- aov(PSR.modelo1)
```

```
summary(ANOVA)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
suelo	1	13.27	13.268	7.988	0.0122 *
endof	1	0.02	0.020	0.012	0.9143
suelo:endof	1	12.06	12.059	7.260	0.0160 *
Residuals	16	26.58	1.661		

```
---
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

```
# A tibble: 8 x 9
```

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 suelo	A	B	0	1.63	0.407	2.85	0.0122	*
2 endof	A	B	0	0.0630	-1.16	1.28	0.914	ns

3 suelo:endof A:A	B:A	0	3.18	0.850	5.51	0.00623	**
4 suelo:endof A:A	A:B	0	1.62	-0.716	3.95	0.235	ns
5 suelo:endof A:A	B:B	0	1.69	-0.640	4.02	0.203	ns
6 suelo:endof B:A	A:B	0	-1.57	-3.90	0.766	0.258	ns
7 suelo:endof B:A	B:B	0	-1.49	-3.82	0.842	0.297	ns
8 suelo:endof A:B	B:B	0	0.0760	-2.26	2.41	1	ns

Análisis de hongos de suelo

glm.nb(formula = hongos ~ Fendofitos * Fmedio, data = dat, init.theta = 1.167015884, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.82868	-0.74158	0.04634	0.33431	1.26885

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.45316	0.42155	8.192	2.58B16 ***
Fendofitos2	-0.03871	0.59637	-0.065	0.948
Fmedio2	-0.56279	0.60016	-0.938	0.348
Fmedio3	-0.03871	0.59637	-0.065	0.948
Fmedio4	-0.18740	0.59726	-0.314	0.754
Fendofitos2:Fmedio2	0.60150	0.84608	0.711	0.477
Fendofitos2:Fmedio3	-0.20604	0.84463	-0.244	0.807
Fendofitos2:Fmedio4	0.32257	0.84368	0.382	0.702

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.167) family taken to be 1)

Null deviance: 51.408 on 39 degrees of freedom
 Residual deviance: 49.774 on 32 degrees of freedom
 AIC: 365.18

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.167

Std. Err.: 0.292

2 x log-likelihood: -347.183

m1 <- glmer (penicillium ~ Fendofito*Fmedio + (1|maceta), data =dat, family = poisson)

summary(m1)

Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace Approximation) [

glmerMod]

Family: poisson (log)

Formula: penicillium ~ Fendofito * Fmedio + (1 | maceta)

Data: dat

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
365.1	378.1	-177.6	355.1	95

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.2425	-0.8462	-0.4088	0.7162	3.5547

Random effects:

Groups Name	Variance	Std.Dev.
maceta (Intercept)	0.617	0.7855

Number of obs: 100, groups: maceta, 10

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.25677	0.38203	0.672	0.501505
Fendofito2	-0.05748	0.51557	-0.111	0.911233
Fmedio2	0.48729	0.19205	2.537	0.011173 *
Fendofito2:Fmedio2	-1.35229	0.35064	-3.857	0.000115 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr)	Fndft2	Fmedi2
Fendofito2	-0.676		
Fmedio2	-0.311	0.231	
Fndft2:Fmd2	0.171	-0.267	-0.548

Análisis de la colonización micorrícica

Tabla de valores

Micorrizas total

```
m0 <- glm.nb(Total ~ 1, data = datos)
m1 <- glm.nb(Total ~ Trat.soil, data = datos)
m2 <- glm.nb(Total ~ Trat.end, data = datos)
m3 <- glm.nb(Total ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos)
m4 <- glm.nb(Total ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos)
```

```
summary(m1)
```

Call:

```
glm.nb(formula = Total ~ Trat.soil, data = datos, init.theta = 1.468749202,
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.6843	-0.5967	-0.1718	0.4362	1.6913

Coefficients:

Estimate Std. Error z value Pr(|z|)
(Intercept) 6.6555 0.5920 11.242 < 2B16 ***
Trat.soil -1.9541 0.3788 -5.159 2.49B07 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.4687) family taken to be 1)

Null deviance: 47.601 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 23.991 on 18 degrees of freedom
AIC: 194.56

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.469
Std. Err.: 0.521

2 x log-likelihood: -188.560

summary(m2)

Call:
glm.nb(formula = Total ~ Trat.end, data = datos, init.theta = 0.7583896882,
link = log)

Deviance Residuals:
Min 1Q Median 3Q Max
-2.4379 -1.0290 -0.1530 0.5822 0.8212

Coefficients:
Estimate Std. Error z value Pr(|z|)
(Intercept) 5.3398 0.8164 6.541 6.12B11 ***
Trat.end -0.8591 0.5172 -1.661 0.0967 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(0.7584) family taken to be 1)

Null deviance: 26.410 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 23.729 on 18 degrees of freedom
AIC: 207.53

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 0.758
Std. Err.: 0.228

2 x log-likelihood: -201.534

summary(m3)

Call:
glm.nb(formula = Total ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos,

init.theta = 5.02189663, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.7861	-0.8347	-0.4417	0.6191	2.0486

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	8.8592	0.4868	18.200	< 2B16 ***
Trat.soil	-2.2549	0.2257	-9.990	< 2B16 ***
Trat.end	-1.2910	0.2237	-5.772	7.83B09 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(5.0219) family taken to be 1)

Null deviance: 132.854 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 27.237 on 17 degrees of freedom
AIC: 178.7

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 5.02
Std. Err.: 2.37

2 x log-likelihood: -170.701

summary(m4)

Call:

glm.nb(formula = Total ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos,
init.theta = 20.98333747, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.36813	-0.92816	-0.00578	0.36755	2.86538

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	5.8718	0.6050	9.706	< 2B16 ***
Trat.soil	-0.1459	0.4456	-0.327	0.7433
Trat.end	0.7887	0.4308	1.831	0.0672 .
Trat.soil:Trat.end	-1.5147	0.3406	-4.447	8.71B06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(20.9833) family taken to be 1)

Null deviance: 362.027 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 31.729 on 16 degrees of freedom
AIC: 165.62

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 21.0
Std. Err.: 13.6

2 x log-likelihood: -155.625

```
##Parametro de sobredispersión m1
e1 <- resid(m1, type = "pearson")
dispersion <-sum(e1^2) / (m1$df.res)
dispersion
[1] 0.832824
```

```
##Parametro de sobredispersión m2
e1 <- resid(m2, type = "pearson")
dispersion <-sum(e1^2) / (m2$df.res)
dispersion
[1] 0.5874114
```

```
##Parametro de sobredispersión m3
e1 <- resid(m3, type = "pearson")
dispersion <-sum(e1^2) / (m3$df.res)
dispersion
[1] 1.30971
```

```
##Parametro de sobredispersión m4
e1 <- resid(m4, type = "pearson")
dispersion <-sum(e1^2) / (m4$df.res)
dispersion
[1] 2.140163
```

```
##Ver cual es el mejor modelo para presentar en los resultados
anova(m0, m1, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.6788801	19	-204.0697				
2	Trat.soil 1.4687492	18	-188.5601	1 vs 2	1	15.50967	8.208442B05

```
anova(m0, m2, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.6788801	19	-204.0697				
2	Trat.end 0.7583897	18	-201.5336	1 vs 2	1	2.536108	0.01112687

```
anova(m1, m3, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil 1.468749	18	-188.5601				
2	Trat.soil + Trat.end 5.021897	17	-170.7009	1 vs 2	1	17.85913	2.378756B05

```
anova(m1, m4, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil	1.468749	18	-188.5601				
2	Trat.soil * Trat.end	20.983337	16	-155.6245	1 vs 2	2	32.93557	7.049086B08

Arbúsculos

```
fit_nbinom <- glm.nb(A ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos)
```

```
# Resumen del modelo  
summary(fit_nbinom)
```

Call:

```
glm.nb(formula = A ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos, init.theta = 30.72772999,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.0407	-0.9612	-0.6328	0.7480	2.3998

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	10.1301	0.4546	22.29	<2B16 ***
Trat.soil	-4.2386	0.3687	-11.50	<2B16 ***
Trat.end	-1.4047	0.1540	-9.12	<2B16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(30.7277) family taken to be 1)

Null deviance: 544.970 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 27.468 on 17 degrees of freedom
AIC: 109.16

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 30.7
Std. Err.: 26.2

2 x log-likelihood: -101.161

```
m0 <- glm.nb(A ~ 1, data = datos)  
m1 <- glm.nb(A ~ Trat.soil, data = datos)  
m2 <- glm.nb(A ~ Trat.end, data = datos)  
m3 <- glm.nb(A ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos)  
m4 <- glm.nb(A ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos)
```

```
summary(m1)
```

Call:

```
glm.nb(formula = A ~ Trat.soil, data = datos, init.theta = 1.690387832,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.6096	-1.1445	-0.8755	0.4077	2.2589

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	8.2451	0.6542	12.602	<2B16 ***
Trat.soil	-4.2341	0.4951	-8.552	<2B16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.6904) family taken to be 1)

Null deviance: 99.503 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 23.517 on 18 degrees of freedom
AIC: 130.02

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.690
Std. Err.: 0.809

2 x log-likelihood: -124.018

summary(m2)

Call:

glm.nb(formula = A ~ Trat.end, data = datos, init.theta = 384538.2603,
link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-9.476	-5.435	-1.976	3.847	8.507

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	5.2019	0.1339	38.86	<2B16 ***
Trat.end	-1.3975	0.1060	-13.18	<2B16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(384538.3) family taken to be 1)

Null deviance: 954.60 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 735.96 on 18 degrees of freedom
AIC: 805.99

Number of Fisher Scoring iterations: 1

summary(m3)

Call:

```
glm.nb(formula = A ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos, init.theta = 30.72772999,
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.0407	-0.9612	-0.6328	0.7480	2.3998

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	10.1301	0.4546	22.29	<2B16 ***
Trat.soil	-4.2386	0.3687	-11.50	<2B16 ***
Trat.end	-1.4047	0.1540	-9.12	<2B16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(30.7277) family taken to be 1)

Null deviance: 544.970 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 27.468 on 17 degrees of freedom
AIC: 109.16

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 30.7
Std. Err.: 26.2

2 x log-likelihood: -101.161

summary(m4)

Call:

```
glm.nb(formula = A ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos, init.theta = 30.8213907,
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.0693	-0.9398	-0.5684	0.7590	2.2675

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	9.4630	1.3440	7.041	1.91B12 ***
Trat.soil	-3.5903	1.2863	-2.791	0.00525 **
Trat.end	-0.8357	1.1194	-0.747	0.45532
Trat.soil:Trat.end	-0.5551	1.0864	-0.511	0.60938

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(30.8214) family taken to be 1)

Null deviance: 545.59 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 27.19 on 16 degrees of freedom
AIC: 110.86

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 30.8
Std. Err.: 26.3

2 x log-likelihood: -100.864

anova(m0, m1, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: A

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.2481663	19	-150.8152				
2	Trat.soil 1.6903878	18	-124.0177	1 vs 2	1	26.79743	2.259372B07

anova(m0, m2, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: A

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 2.481663B01	19	-150.8152				
2	Trat.end 3.845383A05	18	-799.9858	1 vs 2	1	22.85721	1.744934B06

anova(m1, m3, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: A

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil 1.690388	18	-124.0177				
2	Trat.soil + Trat.end 30.727730	17	-101.1605	1 vs 2	1	22.85721	1.744934B06

anova(m1, m4, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: A

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil 1.690388	18	-124.0177				
2	Trat.soil * Trat.end 30.821391	16	-100.8640	1 vs 2	2	23.15376	9.380456B06

Vesículas

summary(fit_nbinom)

Call:

glm.nb(formula = V ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos, init.theta = 1.153687015,
link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.3542	-0.4800	-0.3839	0.2921	1.4011

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	7.4760	1.5481	4.829	1.37B06 ***
Trat.soil	-4.5609	1.0981	-4.153	3.28B05 ***
Trat.end	-0.4651	0.6008	-0.774	0.439

Signif. codes: 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.1537) family taken to be 1)

Null deviance: 53.530 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 16.294 on 17 degrees of freedom
AIC: 79.713

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.154
Std. Err.: 0.676

2 x log-likelihood: -71.713

##Hago un modelo para cada combinacion de variables, desde ninguna hasta la que incluye ambas con interaccion

```
m0 <- glm.nb(V ~ 1, data = datos)
m1 <- glm.nb(V ~ Trat.soil, data = datos)
m2 <- glm.nb(V ~ Trat.end, data = datos)
m3 <- glm.nb(V ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos)
m4 <- glm.nb(V ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos)
```

summary(m1)

Call:
glm.nb(formula = V ~ Trat.soil, data = datos, init.theta = 1.110910132,
link = log)

Deviance Residuals:
Min 1Q Median 3Q Max
-2.2297 -0.4376 -0.4376 0.1215 1.5030

Coefficients:
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) 6.763 1.222 5.534 3.12B08 ***
Trat.soil -4.533 1.091 -4.154 3.27B05 ***

Signif. codes: 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.1109) family taken to be 1)

Null deviance: 52.364 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 16.561 on 18 degrees of freedom
AIC: 78.308

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.111
Std. Err.: 0.644

2 x log-likelihood: -72.308

summary(m2)

Call:

```
glm.nb(formula = V ~ Trat.end, data = datos, init.theta = 76165.66359,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3.317	-2.924	-2.793	2.438	4.884

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2.0485	0.3136	6.531	6.52B11 ***
Trat.end	-0.3438	0.2093	-1.642	0.101

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(76165.66) family taken to be 1)

Null deviance: 183.51 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 180.78 on 18 degrees of freedom
AIC: 222.12

Number of Fisher Scoring iterations: 1

summary(m3)

Call:

```
glm.nb(formula = V ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos, init.theta = 1.153687015,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.3542	-0.4800	-0.3839	0.2921	1.4011

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	7.4760	1.5481	4.829	1.37B06 ***
Trat.soil	-4.5609	1.0981	-4.153	3.28B05 ***
Trat.end	-0.4651	0.6008	-0.774	0.439

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.1537) family taken to be 1)

Null deviance: 53.530 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 16.294 on 17 degrees of freedom
AIC: 79.713

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.154
Std. Err.: 0.676

2 x log-likelihood: -71.713

summary(m4)

Call:

glm.nb(formula = V ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos, init.theta = 1.171313931,
link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.33349	-0.60770	-0.00006	0.26288	1.10597

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-11.67	6950.53	-0.002	0.999
Trat.soil	14.38	6950.53	0.002	0.998
Trat.end	18.04	6950.53	0.003	0.998
Trat.soil:Trat.end	-18.37	6950.53	-0.003	0.998

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.1713) family taken to be 1)

Null deviance: 54.002 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 15.448 on 16 degrees of freedom
AIC: 80.735

anova(m0, m1, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: V

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 83413.60582	19	-218.85570				
2	Trat.soil 1.11091	18	-72.30803	1 vs 2	1	146.5477	0

anova(m0, m2, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: V

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 83413.61	19	-218.8557				
2	Trat.end 76165.66	18	-216.1183	1 vs 2	1	2.737359	0.09802668

anova(m1, m3, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: V

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil 1.110910	18	-72.30803				
2	Trat.soil + Trat.end 1.153687	17	-71.71261	1 vs 2	1	0.5954211	0.4403304

anova(m1, m4, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: V

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil 1.110910	18	-72.30803				
2	Trat.soil * Trat.end 1.171314	16	-70.73501	1 vs 2	2	1.573019	0.4554317

Coils

```
fit_nbinom <- glm.nb(C ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos)
```

```
# Resumen del modelo  
summary(fit_nbinom)
```

Call:

```
glm.nb(formula = C ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos, init.theta = 2.217905734,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.74835	-0.25454	-0.00008	-0.00004	1.62639

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	25.7078	4530.3267	0.006	0.99547
Trat.soil	-21.9314	4530.3266	-0.005	0.99614
Trat.end	-1.4939	0.5401	-2.766	0.00567 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(2.2179) family taken to be 1)

Null deviance: 65.222 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 10.999 on 17 degrees of freedom
AIC: 59.793

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 2.22
Std. Err.: 1.55

2 x log-likelihood: -51.793

##Hago un modelo para cada combinacion de variables, desde ninguna hasta la que incluye ambas con interaccion

```
m0 <- glm.nb(C ~ 1, data = datos)  
m1 <- glm.nb(C ~ Trat.soil, data = datos)  
m2 <- glm.nb(C ~ Trat.end, data = datos)  
m3 <- glm.nb(C ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos)  
m4 <- glm.nb(C ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos)
```

```
summary(m1)
```

Call:

```
glm.nb(formula = C ~ Trat.soil, data = datos, init.theta = 1.016839455,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-----	----	--------	----	-----

-1.98199 -0.33213 -0.00003 -0.00003 1.27672

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	24.89	8103.08	0.003	0.998
Trat.soil	-23.09	8103.08	-0.003	0.998

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.0168) family taken to be 1)

Null deviance: 43.947 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 11.113 on 18 degrees of freedom
AIC: 63.415

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.017
Std. Err.: 0.539

2 x log-likelihood: -57.415

summary(m2)

Call:

```
glm.nb(formula = C ~ Trat.end, data = datos, init.theta = 0.293839392,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.29920	-1.04217	-0.95650	0.08937	1.32901

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	3.0832	1.3690	2.252	0.0243 *
Trat.end	-1.4939	0.8899	-1.679	0.0932 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(0.2938) family taken to be 1)

Null deviance: 20.077 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 17.402 on 18 degrees of freedom
AIC: 81.812

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 0.294
Std. Err.: 0.139

2 x log-likelihood: -75.812

summary(m3)

Call:

```
glm.nb(formula = C ~ Trat.soil + Trat.end, data = datos, init.theta = 2.217905734,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.74835	-0.25454	-0.00008	-0.00004	1.62639

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	25.7078	4530.3267	0.006	0.99547
Trat.soil	-21.9314	4530.3266	-0.005	0.99614
Trat.end	-1.4939	0.5401	-2.766	0.00567 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(2.2179) family taken to be 1)

Null deviance: 65.222 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 10.999 on 17 degrees of freedom
AIC: 59.793

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 2.22
Std. Err.: 1.55

2 x log-likelihood: -51.793

summary(m4)

Call:

```
glm.nb(formula = C ~ Trat.soil * Trat.end, data = datos, init.theta = 2.217905734,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.74835	-0.25454	-0.00006	-0.00006	1.62639

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	27.855	15541.864	0.002	0.999
Trat.soil	-24.079	15541.864	-0.002	0.999
Trat.end	-2.988	9829.538	0.000	1.000
Trat.soil:Trat.end	1.494	9829.538	0.000	1.000

(Dispersion parameter for Negative Binomial(2.2179) family taken to be 1)

Null deviance: 65.222 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 10.999 on 16 degrees of freedom
AIC: 61.793

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 2.22
Std. Err.: 1.55

2 x log-likelihood: -51.793

anova(m0, m1, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: C

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1	0.2339081	19	-78.21848				
2	Trat.soil	1.0168395	18	-57.41529	1 vs 2	1	20.80319	5.089824B06

anova(m0, m2, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: C

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1	0.2339081	19	-78.21848				
2	Trat.end	0.2938394	18	-75.81191	1 vs 2	1	2.406566	0.1208271

anova(m1, m3, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: C

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil	1.016839	18	-57.41529				
2	Trat.soil + Trat.end	2.217906	17	-51.79311	1 vs 2	1	5.622186	0.01773452

anova(m1, m4, test = "Chisq")

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: C

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	Trat.soil	1.016839	18	-57.41529				
2	Trat.soil * Trat.end	2.217906	16	-51.79311	1 vs 2	2	5.622186	0.06013923

Anexo estadístico del capítulo 2

Análisis de los parámetros de suelo de T1 (fase de acondicionamiento)

Análisis de pH

```
Modelo1<-aov(pH~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)
summary(Modelo1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Estatus.Jatropha curcas	1	0.04320	0.04320	9.159	0.0164 *
Estatus.endofitos	1	0.04320	0.04320	9.159	0.0164 *
Estatus.Jatropha curcas:Estatus.endofitos	1	0.01763	0.01763	3.739	0.0892 .
Residuals	8	0.03773	0.00472		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Shapiro-Wilk normality test

data: re

W = 0.96809, p-value = 0.8898

```
library(car)
```

```
leveneTest(pH~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

	Df	F value	Pr(>F)
group	3	1.1261	0.3947
	8		

Bartlett test of homogeneity of variances

data: pH by JE

Bartlett's K-squared = 5.6221, df = 3, p-value = 0.1315

```
Modelo2<-aov(pH~JE, data = datos)
```

```
summary(Modelo2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
JE	3	0.10403	0.03468	7.352	0.011 *
Residuals	8	0.03773	0.00472		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
Comparacion <- glht(Modelo2, linfct = mcp(JE = "Tukey"))
```

```
summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: aov(formula = pH ~ JE, data = datos)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
A.B - B.B == 0	-4.333B02	5.608B02	-0.773	0.8646

```

B.A - B.B == 0 1.967B01 5.608B02 3.507 0.0325 *
A.A - B.B == 0 3.966B17 5.608B02 0.000 1.0000
B.A - A.B == 0 2.400B01 5.608B02 4.280 0.0112 *
A.A - A.B == 0 4.333B02 5.608B02 0.773 0.8646
A.A - B.A == 0 -1.967B01 5.608B02 -3.507 0.0326 *

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- singlBstep method)

Conductividad eléctrica

```

Modelo1<-aov(CE~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)
summary(Modelo1)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
Estatus.Jatropha curcas	1	0.000133	0.000133	0.044	0.8398
Estatus.endofitos	1	0.013333	0.013333	4.360	0.0702 .
Estatus.Jatropha curcas:Estatus.endofitos	1	0.013333	0.013333	4.360	0.0702 .
Residuals	8	0.024467	0.003058		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
shapiro.test(re)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: re
W = 0.94347, p-value = 0.5443 Supuesto de normalidad

```

JE <- interaction(Estatus.Jatropha curcas, Estatus.endofitos, drop = TRUE)
bartlett.test(pH~JE, datos)

```

Bartlett test of homogeneity of variances

data: pH by JE
Bartlett's K-squared = 5.6221, df = 3, p-value = 0.1315
 Supuesto de homocedacia

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: aov(formula = CE ~ JE, data = datos)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(t)
A.B - B.B == 0	-6.000B02	4.515B02	-1.329	0.5718
B.A - B.B == 0	-1.333B01	4.515B02	-2.953	0.0711 .
A.A - B.B == 0	-6.000B02	4.515B02	-1.329	0.5717
B.A - A.B == 0	-7.333B02	4.515B02	-1.624	0.4182
A.A - A.B == 0	-2.082B17	4.515B02	0.000	1.0000
A.A - B.A == 0	7.333B02	4.515B02	1.624	0.4184

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
 (Adjusted p values reported -- singlBstep method)

Carbono

```
Modelo1<-aov(C~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)
summary(Modelo1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
Estatus.Jatropha curcas	1	0.03203	0.03203	1.795	0.217
Estatus.endofitos	1	0.00963	0.00963	0.540	0.484
Estatus.Jatropha curcas:Estatus.endofitos	1	0.05880	0.05880	3.294	0.107
Residuals	8	0.14280	0.01785		

```
shapiro.test(re)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: re
```

```
W = 0.95247, p-value = 0.6733
```

```
JE <- interaction(Estatus.Jatropha curcas, Estatus.endofitos, drop = TRUE)
```

```
bartlett.test(C~JE, datos)
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: C by JE
```

```
Bartlett's K-squared = 3.0627, df = 3, p-value = 0.3821
```

```
# Supuesto de homocedacia
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: aov(formula = C ~ JE, data = datos)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(t)
A.B - B.B == 0	0.24333	0.10909	2.231	0.195
B.A - B.B == 0	0.08333	0.10909	0.764	0.868
A.A - B.B == 0	0.04667	0.10909	0.428	0.972
B.A - A.B == 0	-0.16000	0.10909	-1.467	0.497
A.A - A.B == 0	-0.19667	0.10909	-1.803	0.338
A.A - B.A == 0	-0.03667	0.10909	-0.336	0.986

(Adjusted p values reported -- singlBstep method)

Analisis de fósforo

```
Modelo1<-aov(P~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)
summary(Modelo1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
--	----	--------	---------	---------	-------

```

Estatus.Jatropha curcas      1 0.361 0.361 0.108 0.751
Estatus.endofitos           1 5.993 5.993 1.799 0.217
Estatus.Jatropha curcas:Estatus.endofitos 1 0.886 0.886 0.266 0.620
Residuals                   8 26.652 3.332

```

```
shapiro.test(re)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: re
```

```
W = 0.96085, p-value = 0.7958
```

```

JE <- interaction(Estatus.Jatropha curcas, Estatus.endofitos, drop = TRUE)
bartlett.test(P~JE, datos)

```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: P by JE
```

```
Bartlett's K-squared = 2.5707, df = 3, p-value = 0.4626
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: aov(formula = P ~ JE, data = datos)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
A.B - B.B == 0	0.8900	1.4903	0.597	0.930
B.A - B.B == 0	-0.8700	1.4903	-0.584	0.934
A.A - B.B == 0	-1.0667	1.4903	-0.716	0.888
B.A - A.B == 0	-1.7600	1.4903	-1.181	0.654
A.A - A.B == 0	-1.9567	1.4903	-1.313	0.581
A.A - B.A == 0	-0.1967	1.4903	-0.132	0.999

(Adjusted p values reported -- singlBstep method)

Análisis de nitrógeno

```

Modelo1<-aov(N~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)
summary(Modelo1)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Estatus.Jatropha curcas	1	0.0000750	0.0000750	0.750	0.412
Estatus.endofitos	1	0.0002083	0.0002083	2.083	0.187
Estatus.Jatropha curcas:Estatus.endofitos	1	0.0002083	0.0002083	2.083	0.187
Residuals	8	0.0008000	0.0001000		

```
shapiro.test(re)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: re
W = 0.84944, p-value = 0.03613 No cumple normalidad

```
JE <- interaction(Estatus.Jatropha curcas, Estatus.endofitos, drop = TRUE)  
bartlett.test(N~JE, datos)
```

Bartlett test of homogeneity of variances

data: N by JE
Bartlett's K-squared = 0.86607, df = 3, p-value = 0.8336
 Supuesto de homocedacia

```
Comparacion <- glht(Modelo2, linfct = mcp(JE = "Tukey"))  
summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = N ~ JE, data = datos)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
A.B - B.B == 0	1.333B02	8.165B03	1.633	0.414
B.A - B.B == 0	4.416B17	8.165B03	0.000	1.000
A.A - B.B == 0	-3.333B03	8.165B03	-0.408	0.976
B.A - A.B == 0	-1.333B02	8.165B03	-1.633	0.414
A.A - A.B == 0	-1.667B02	8.165B03	-2.041	0.250
A.A - B.A == 0	-3.333B03	8.165B03	-0.408	0.976

(Adjusted p values reported -- singlBstep method)

Análisis de C/N

```
Modelo1<-aov(C.N~Estatus.Jatropha curcas*Estatus.endofitos, data = datos)  
summary(Modelo1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Estatus.Jatropha curcas	1	0.0981	0.09810	0.336	0.578
Estatus.endofitos	1	0.1207	0.12071	0.413	0.538
Estatus.Jatropha curcas:Estatus.endofitos	1	0.0702	0.07017	0.240	0.637
Residuals	8	2.3379	0.29224		

```
shapiro.test(re)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: re
W = 0.92865, p-value = 0.3661 Supuesto de normalidad

```
JE <- interaction(Estatus.Jatropha curcas, Estatus.endofitos, drop = TRUE)
```

bartlett.test(C.N~JE, datos)

Bartlett test of homogeneity of variances

data: C.N by JE

Bartlett's K-squared = 0.35113, df = 3, p-value = 0.9501

Supuesto de homocedacia

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = C.N ~ JE, data = datos)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(t)
A.B - B.B == 0	0.33377	0.44139	0.756	0.872
B.A - B.B == 0	0.35354	0.44139	0.801	0.852
A.A - B.B == 0	0.38142	0.44139	0.864	0.823
B.A - A.B == 0	0.01976	0.44139	0.045	1.000
A.A - A.B == 0	0.04765	0.44139	0.108	1.000
A.A - B.A == 0	0.02789	0.44139	0.063	1.000

(Adjusted p values reported -- singlBstep method)

Análisis de los parámetros de suelo de T2 (fase respuesta)

Jatropha curcas

pH

ANOVA <- aov(pH.modelo1)

summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	0.00653	0.00653	1.686	0.2303
trat.end	1	0.03630	0.03630	9.368	0.0156 *
trat.jat:trat.end	1	0.00163	0.00163	0.422	0.5344
Residuals	8	0.03100	0.00387		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	0.0467	-0.0362	0.130	0.23	ns
2 trat.end	A	B	0	-0.110	-0.193	-0.0271	0.0156	*
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	0.0700	-0.0928	0.233	0.545	ns
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	-0.0867	-0.249	0.0761	0.381	ns

5	trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-0.0633	-0.226	0.0994	0.618	ns
6	trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	-0.157	-0.319	0.00610	0.0592	ns
7	trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	-0.133	-0.296	0.0294	0.113	ns
8	trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	0.0233	-0.139	0.186	0.966	ns

Conductividad eléctrica

```
ANOVA <- aov(CE.model1)
summary(ANOVA)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	0.004033	0.004033	1.613	0.2397
trat.end	1	0.001200	0.001200	0.480	0.5080
trat.jat:trat.end	1	0.012033	0.012033	4.813	0.0596 .
Residuals	8	0.020000	0.002500		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif	
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr	
1	trat.jat	A	B	0	0.0367	-0.0299	0.103	0.24	ns
2	trat.end	A	B	0	0.0200	-0.0466	0.0866	0.508	ns
3	trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-0.0267	-0.157	0.104	0.912	ns
4	trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	-0.0433	-0.174	0.0874	0.721	ns
5	trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	0.0567	-0.0741	0.187	0.539	ns
6	trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	-0.0167	-0.147	0.114	0.976	ns
7	trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	0.0833	-0.0474	0.214	0.25	ns
8	trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	0.1	-0.0307	0.231	0.144	ns

Carbono

```
ANOVA <- aov(C.model1)
summary(ANOVA)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	0.750	0.7500	0.590	0.465
trat.end	1	0.590	0.5896	0.464	0.515
trat.jat:trat.end	1	0.496	0.4961	0.390	0.550
Residuals	8	10.177	1.2721		

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif	
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr	
1	trat.jat	A	B	0	-0.500	-2.00	1.00	0.465	ns
2	trat.end	A	B	0	0.443	-1.06	1.94	0.515	ns
3	trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-0.0933	-3.04	2.86	1	ns
4	trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	0.850	-2.10	3.80	0.794	ns
5	trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-0.0567	-3.01	2.89	1	ns
6	trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	0.943	-2.01	3.89	0.741	ns
7	trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	0.0367	-2.91	2.99	1	ns
8	trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	-0.907	-3.86	2.04	0.762	ns

Fósforo

```
ANOVA <- aov(P.modelo1)
summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
trat.jat    1  0.02   0.02  0.037  0.851
trat.end    1  4.47   4.47  7.429  0.026 *
trat.jat:trat.end 1 41.52 41.52 69.073 3.32B05 ***
Residuals   8  4.81   0.60
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
# A tibble: 8 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr>        <chr> <chr>  <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 trat.jat      A   B      0 -0.0867 -1.12  0.945 0.851 ns
2 trat.end      A   B      0 -1.22  -2.25 -0.188 0.026 *
3 trat.jat:trat.end A:A  B:A      0 -3.81  -5.83 -1.78 0.00143 **
4 trat.jat:trat.end A:A  A:B      0 -4.94  -6.97 -2.91 0.00024 ***
5 trat.jat:trat.end A:A  B:B      0 -1.31  -3.33  0.720 0.243 ns
6 trat.jat:trat.end B:A  A:B      0 -1.13  -3.16  0.894 0.344 ns
7 trat.jat:trat.end B:A  B:B      0  2.5   0.473  4.53 0.0178 *
8 trat.jat:trat.end A:B  B:B      0  3.63  1.61  5.66 0.00194 **
```

Cenizas

```
ANOVA <- aov(Cenizas.modelo1)
summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
trat.jat    1  1.78   1.78  0.265 0.6207
trat.end    1 32.93 32.93  4.906 0.0576 .
trat.jat:trat.end 1  0.40   0.40  0.059 0.8142
Residuals   8 53.71  6.71
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
# A tibble: 8 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr>        <chr> <chr>  <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 trat.jat      A   B      0 -0.770 -4.22  2.68 0.621 ns
2 trat.end      A   B      0  3.31  -0.136  6.76 0.0576 ns
3 trat.jat:trat.end A:A  B:A      0 -1.13  -7.91  5.64 0.948 ns
4 trat.jat:trat.end A:A  A:B      0  2.95  -3.82  9.72 0.536 ns
5 trat.jat:trat.end A:A  B:B      0  2.54  -4.23  9.32 0.642 ns
6 trat.jat:trat.end B:A  A:B      0  4.08  -2.69 10.9 0.289 ns
7 trat.jat:trat.end B:A  B:B      0  3.68  -3.10 10.5 0.366 ns
8 trat.jat:trat.end A:B  B:B      0 -0.407 -7.18  6.37 0.997 ns
```

Jacaranda miosifolia

pH

```
ANOVA <- aov(pH.modelo1)
summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trat.jat    1 0.00141 0.001408  0.100 0.760
trat.end    1 0.00188 0.001875  0.133 0.725
trat.jat:trat.end 1 0.02708 0.027075  1.925 0.203
Residuals   8 0.11253 0.014067
tukey_hsd(ANOVA)
# A tibble: 8 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr         <chr <chr   <dbl <dbl <dbl <dbl><dbl><chr
1 trat.jat      A     B       0 -0.0217  -0.180  0.136 0.76 ns
2 trat.end      A     B       0 -0.0250  -0.183  0.133 0.725 ns
3 trat.jat:trat.end A:A   B:A     0 -0.117  -0.427  0.193 0.641 ns
4 trat.jat:trat.end A:A   A:B     0 -0.120  -0.430  0.190 0.622 ns
5 trat.jat:trat.end A:A   B:B     0 -0.0467  -0.357  0.263 0.961 ns
6 trat.jat:trat.end B:A   A:B     0 -0.00333 -0.313  0.307 1 ns
7 trat.jat:trat.end B:A   B:B     0 0.0700  -0.240  0.380 0.885 ns
8 trat.jat:trat.end A:B   B:B     0 0.0733  -0.237  0.383 0.871 ns
```

Conductividad eléctrica

```
ANOVA <- aov(CE.modelo1)
summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trat.jat    1 0.000004 0.000004  0.004 0.9530
trat.end    1 0.002324 0.002324  2.102 0.1852
trat.jat:trat.end 1 0.012871 0.012871  11.640 0.0092 **
Residuals   8 0.008846 0.001106
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)
# A tibble: 8 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr         <chr <chr   <dbl <dbl <dbl <dbl><dbl><chr
1 trat.jat      A     B       0 0.00117 -0.0431  0.0454 0.953 ns
2 trat.end      A     B       0 -0.0278  -0.0721  0.0164 0.185 ns
3 trat.jat:trat.end A:A   B:A     0 0.0667  -0.0203  0.154 0.143 ns
4 trat.jat:trat.end A:A   A:B     0 0.0377  -0.0493  0.125 0.54 ns
5 trat.jat:trat.end A:A   B:B     0 -0.0267  -0.114  0.0603 0.763 ns
6 trat.jat:trat.end B:A   A:B     0 -0.0290  -0.116  0.0579 0.717 ns
7 trat.jat:trat.end B:A   B:B     0 -0.0933  -0.180  -0.00639 0.036 *
8 trat.jat:trat.end A:B   B:B     0 -0.0643  -0.151  0.0226 0.161 ns
```

```
#evaluar normalidad con shapiro
pH.modelo1 %>% residuals() %>% shapiro_test()
# A tibble: 1 x 3
  variable statistic p.value
<chr> <dbl> <dbl>
1 . 0.942 0.529
```

```
#evaluar homocedasticidad
levene_test(parametros_suelo_t2_Jm,CE ~ trat.jat * trat.end)
# A tibble: 1 x 4
  df1 df2 statistic  p
  <int<int <dbl<dbl
1 3 8 0.364 0.781
```

Carbono

```
ANOVA <- aov(C.modelo1)
summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
trat.jat      1 0.019 0.0192  0.023 0.883
trat.end      1 2.219 2.2188  2.685 0.140
trat.jat:trat.end 1 1.021 1.0208  1.236 0.299
Residuals    8 6.610 0.8262
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
# A tibble: 8 x 9
  term      group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr    <chr <chr    <dbl <dbl <dbl <dbl<dbl<chr
1 trat.jat  A  B      0 -0.0800 -1.29  1.13 0.883 ns
2 trat.end  A  B      0 0.860 -0.350  2.07 0.14 ns
3 trat.jat:trat.end A:A  B:A    0 -0.663 -3.04  1.71 0.808 ns
4 trat.jat:trat.end A:A  A:B    0 0.277 -2.10  2.65 0.981 ns
5 trat.jat:trat.end A:A  B:B    0 0.780 -1.60  3.16 0.726 ns
6 trat.jat:trat.end B:A  A:B    0 0.94 -1.44  3.32 0.606 ns
7 trat.jat:trat.end B:A  B:B    0 1.44 -0.933 3.82 0.283 ns
8 trat.jat:trat.end A:B  B:B    0 0.503 -1.87  2.88 0.903 ns
```

Fosforo

```
ANOVA <- aov(P.modelo1)
summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
trat.jat      1 1.888 1.888 0.908 0.369
trat.end      1 0.572 0.572 0.275 0.614
trat.jat:trat.end 1 1.080 1.080 0.519 0.492
Residuals    8 16.643 2.080
```

```
tukey_hsd(ANOVA)
# A tibble: 7 x 9
  term      group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr    <chr <chr    <dbl <dbl <dbl <dbl<dbl<chr
1 trat.jat  A  B      0 -0.793 -2.71  1.13 0.369 ns
2 trat.end  A  B      0 -0.437 -2.36  1.48 0.614 ns
3 trat.jat:trat.end A:A  B:A    0 -1.39 -5.16  2.38 0.653 ns
4 trat.jat:trat.end A:A  A:B    0 -1.04 -4.81  2.73 0.815 ns
5 trat.jat:trat.end A:A  B:B    0 -1.23 -5.00  2.54 0.73 ns
6 trat.jat:trat.end B:A  A:B    0 0.357 -3.41  4.13 0.99 ns
7 trat.jat:trat.end B:A  B:B    0 0.163 -3.61  3.93 0.999 ns
```

8 trat.jat:trat.end A:B B:B 0 -0.193 -3.96 3.58 0.998 ns

Cenizas

ANOVA <- aov(Cenizas.modelo1)

summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	8.88	8.88	5.175	0.052491 .
trat.end	1	1.50	1.50	0.874	0.377326
trat.jat:trat.end	1	47.92	47.92	27.941	0.000741 ***
Residuals	8	13.72	1.72		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	1.72	-0.0235	3.46	0.0525	ns
2 trat.end	A	B	0	0.707	-1.04	2.45	0.377	ns
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-2.28	-5.70	1.15	0.223	ns
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	-3.29	-6.71	0.134	0.0597	ns
5 trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	2.43	-0.998	5.85	0.185	ns
6 trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	-1.01	-4.44	2.41	0.781	ns
7 trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	4.70	1.28	8.13	0.00985	**
8 trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	5.72	2.29	9.14	0.00305	**

*Análisis de biomasa y crecimiento vegetal de las plantas en la fase respuesta (Segunda generación de plantas: *Jatropha curcas* y *J mimosifolia*)*

*Análisis de los parámetros de crecimiento de *Jatropha curcas**

LV (largo de vástago)

Jatropha curcas.modelo1 <- aov(LV ~ trat.jat*trat.end, data= Jatropha curcas)

summary(Jatropha curcas.modelo1)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	15.7	15.73	0.847	0.364
trat.end	1	34.6	34.60	1.864	0.181
trat.jat:trat.end	1	30.0	30.00	1.616	0.212
Residuals	33	612.5	18.56		

Corro modelo aditivo

Jatropha curcas.modelo1 <- aov(LV ~ trat.jat+trat.end, data= Jatropha curcas)

Anova(Jatropha curcas.modelo1,Type= "II")

Anova Table (Type II tests)

Response: LV

	Sum Sq	Df	F value	Pr(F)
trat.jat	17.11	1	0.9054	0.3481
trat.end	34.60	1	1.8307	0.1850
Residuals	642.54	34		

```

tukey_hsd(Jatropha curcas.modelo1)
# A tibble: 2 x 9
  term  group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr <chr <chr   <dbl <dbl <dbl <dbl<dbl<chr
1 trat.jat A    B      0 -1.30 -4.21  1.60 0.368 ns
2 trat.end A    B      0  1.94 -0.975  4.85 0.185 ns

```

Homocedasticidad

```

levene_test(Jatropha curcas, LV ~ trat.jat*trat.end)
# A tibble: 1 x 4
  df1 df2 statistic p
<int<int <dbl<dbl
1  3  33  0.655 0.585

```

Normalidad

```

aov_residuals<-residuals(object=Jatropha curcas.modelo1)
shapiro.test(x=aov_residuals)

```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: aov_residuals
W = 0.97881, p-value = 0.6903

```

```

qqPlot(Jatropha curcas.modelo1)
[1] 4 18

```

LR (Largo raíz)

```

Jatropha curcas.modelo1 <- aov( LR ~ trat.jat*trat.end, data= Jatropha curcas)
summary(Jatropha curcas.modelo1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(F)
trat.jat    1  20.3  20.258  1.485 0.232
trat.end    1  30.2  30.189  2.214 0.146
trat.jat:trat.end 1   4.9   4.856  0.356 0.555
Residuals  33 450.1  13.638

```

Corro modelo aditivo

```

Jatropha curcas.modelo1 <- aov( LR ~ trat.jat+trat.end, data= Jatropha curcas)
Anova(Jatropha curcas.modelo1,Type= "II")
Anova Table (Type II tests)

```

Response: LR

```

      Sum Sq Df F value Pr(F)
trat.jat 18.82  1  1.4063 0.2439
trat.end 30.19  1  2.2563 0.1423
Residuals 454.91 34

```

tukey_hsd(Jatropha curcas.modelo1)

```

# A tibble: 2 x 9
  term  group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr <chr <chr   <dbl <dbl <dbl <dbl<dbl<chr
1 trat.jat A    B      0  1.48 -0.965  3.93 0.227 ns
2 trat.end A    B      0  1.81 -0.640  4.26 0.142 ns

```

```

Homocedasticidad
#evaluar homocedasticidad
levene_test(Jatropha curcas, LR ~ trat.jat*trat.end)
# A tibble: 1 x 4
  df1 df2 statistic p
  <int<int <dbl<dbl
1 3 33 0.793 0.506

```

```

Normalidad
aov_residuals<-residuals(object=Jatropha curcas.modelo1)
shapiro.test(x=aov_residuals)

```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: aov_residuals
W = 0.97495, p-value = 0.558

```

```

qqPlot(Jatropha curcas.modelo1)
[1] 19 32

```

PFV (Peso fresco vástago)

```

Corro modelo con interacción
Jatropha curcas.modelo2 <- aov( PFV ~ trat.jat*trat.end, data= Jatropha curcas)
summary(Jatropha curcas.modelo2)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	856	855.5	3.962	0.0549 .
trat.end	1	659	659.3	3.053	0.0899 .
trat.jat:trat.end	1	27	26.9	0.125	0.7264
Residuals	33	7126	215.9		

```

---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

Corro modelo aditivo
Jatropha curcas.modelo1 <- aov( PFV ~ trat.jat+trat.end, data= Jatropha curcas)
Anova(Jatropha curcas.modelo1,Type= "II")
Anova Table (Type II tests)

```

```

Response: PFV
      Sum Sq Df F value Pr(F)
trat.jat 899.4 1 4.2749 0.04636 *
trat.end 659.3 1 3.1340 0.08564 .
Residuals 7153.0 34

```

```

---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

tukey_hsd(Jatropha curcas.modelo1)
# A tibble: 2 x 9
  term group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr <chr <chr <dbl <dbl <dbl <dbl <dbl<chr
1 trat.jat A B 0 -9.62 -19.3 0.0749 0.0517 ns
2 trat.end A B 0 8.47 -1.26 18.2 0.0858 ns

```

```

Homocedasticidad
#evaluar homocedasticidad

```

```
levene_test(Jatropha curcas, PFV ~ trat.jat*trat.end)
```

```
# A tibble: 1 x 4
```

```
  df1 df2 statistic  p
  <int<int <dbl<dbl
1   3  33   0.656 0.585
```

Normalidad

```
aov_residuals<-residuals(object=Jatropha curcas.modelo1)
```

```
shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
```

```
W = 0.96404, p-value = 0.2704
```

PFR (peso Fresco Raiz)

Corro modelo con interacción

```
Jatropha curcas.modelo2 <- aov( PFR ~ trat.jat*trat.end, data= Jatropha curcas)
```

```
summary(Jatropha curcas.modelo2)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trat.jat      1  8.7   8.66  0.374 0.5450
trat.end      1 72.6  72.62  3.137 0.0858 .
trat.jat:trat.end 1 31.2  31.24  1.349 0.2537
Residuals    33 764.1  23.15
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Corro modelo aditivo

```
Jatropha curcas.modelo1 <- aov( PFR ~ trat.jat+trat.end, data= Jatropha curcas)
```

```
Anova(Jatropha curcas.modelo1,Type="II")
```

```
Anova Table (Type II tests)
```

Response: PFR

```
      Sum Sq Df F value Pr(>F)
trat.jat 10.19  1  0.4354 0.51379
trat.end 72.62  1  3.1046 0.08706 .
Residuals 795.32 34
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
tukey_hsd(Jatropha curcas.modelo1)
```

```
# A tibble: 2 x 9
```

```
  term  group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr <chr <chr    <dbl <dbl <dbl <dbl <dbl<chr
1 trat.jat A   B        0 -0.968 -4.20  2.27 0.547 ns
2 trat.end A   B        0  2.81 -0.432  6.05 0.0872 ns
```

Homocedasticidad

```
levene_test(Jatropha curcas, PFR ~ trat.jat*trat.end)
```

```
# A tibble: 1 x 4
```

```
  df1 df2 statistic  p
  <int<int <dbl<dbl
1   3  33   0.0619 0.980
```

Normalidad

```
aov_residuals<-residuals(object=Jatropha curcas.modelo1)
shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
W = 0.90384, p-value = 0.003776
```

```
qqPlot(Jatropha curcas.modelo1)
[1] 4 36
```

PSV (Peso seco vástago)

Corro modelo con interacción

```
Jatropha curcas.modelo2 <- aov( PSV ~ trat.jat*trat.end, data= Jatropha curcas)
summary(Jatropha curcas.modelo2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	19.4	19.36	1.547	0.2223
trat.end	1	64.2	64.22	5.132	0.0302 *
trat.jat:trat.end	1	8.4	8.36	0.668	0.4197
Residuals	33	412.9	12.51		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Corro modelo aditivo

```
Jatropha curcas.modelo1 <- aov( PSV ~ trat.jat+trat.end, data= Jatropha curcas)
Anova(Jatropha curcas.modelo1,Type= "II")
Anova Table (Type II tests)
```

Response: PSV

	Sum Sq	Df	F value	Pr(F)
trat.jat	21.46	1	1.7322	0.19693
trat.end	64.22	1	5.1824	0.02923 *
Residuals	421.30	34		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
tukey_hsd(Jatropha curcas.modelo1)
```

A tibble: 2 x 9

	term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
*	<chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1	trat.jat	A	B	0	-1.45	-3.80	0.906	0.22	ns
2	trat.end	A	B	0	2.64	0.282	5.00	0.0293	*

Homoceasticidad

```
levene_test(Jatropha curcas, PSV ~ trat.jat*trat.end)
```

A tibble: 1 x 4

	df1	df2	statistic	p
	<int	<int	<dbl	<dbl
1	3	33	0.815	0.495

```
Normalidad
aov_residuals<-residuals(object=Jatropha curcas.modelo1)
shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
W = 0.95885, p-value = 0.1858
```

PSR (Peso Seco Raíz)

Corro modelo con interaccion

```
Jatropha curcas.modelo2 <- aov( PSR ~ trat.jat*trat.end, data= Jatropha curcas)
summary(Jatropha curcas.modelo2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	1.82	1.823	1.685	0.203
trat.end	1	1.07	1.071	0.990	0.327
trat.jat:trat.end	1	1.05	1.047	0.967	0.333
Residuals	33	35.72	1.082		

Corro modelo aditivo

```
Jatropha curcas.modelo1 <- aov( PSR ~ trat.jat+trat.end, data= Jatropha curcas)
Anova(Jatropha curcas.modelo1,Type= "II")
Anova Table (Type II tests)
```

Response: PSR

	Sum Sq	Df	F value	Pr(F)
trat.jat	1.905	1	1.7614	0.1933
trat.end	1.071	1	0.9907	0.3266
Residuals	36.766	34		

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1	trat.jat	A B	0	-0.444	-1.14	0.251	0.203	ns
2	trat.end	A B	0	0.341	-0.356	1.04	0.327	ns

Homoceasticidad

```
levne_test(Jatropha curcas, PSR ~ trat.jat*trat.end)
```

A tibble: 1 x 4

	df1	df2	statistic	p
	<int	<int	<dbl	<dbl
1	3	33	0.156	0.925

Normalidad

```
aov_residuals<-residuals(object=Jatropha curcas.modelo1)
shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
W = 0.8791, p-value = 0.0008134
```

Análisis de los parámetros de crecimiento de *Jacaranda mimosifolia*

LV (largo de vástago)

```
lm(formula = LV ~ trat.jat * trat.end, data = jacaranda)
```

```
ANOVA <- aov(LV.jac.modelo)
summary(ANOVA)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	101.71	101.71	18.245	0.000155 ***
trat.end	1	11.74	11.74	2.106	0.156137
trat.jat:trat.end	1	0.68	0.68	0.123	0.728516
Residuals	33	183.97	5.57		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Test de tukey

```
tukey_hsd(ANOVA)
```

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	-3.32	-4.90	-1.74	0.000155	***
2 trat.end	A	B	0	1.13	-0.455	2.71	0.156	ns
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-3.65	-6.75	-0.542	0.0162	*
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	0.867	-2.07	3.80	0.854	ns
5 trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-2.23	-5.17	0.701	0.188	ns
6 trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	4.51	1.48	7.54	0.00168	**
7 trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	1.41	-1.62	4.44	0.593	ns
8 trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	-3.10	-5.96	-0.244	0.0292	*

LR (largo raíz)

```
lm(formula = LR ~ trat.jat * trat.end, data = jacaranda)
```

```
ANOVA <- aov(LR.jac.modelo)
summary(ANOVA)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	84.3	84.30	1.714	0.1992
trat.end	1	36.2	36.19	0.736	0.3970
trat.jat:trat.end	1	157.2	157.19	3.196	0.0827 .
Residuals	34	1672.2	49.18		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	-2.98	-7.60	1.64	0.199	ns
2 trat.end	A	B	0	1.95	-2.68	6.58	0.397	ns

3	trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-7.27	-16.2	1.66	0.144	ns
4	trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	-2.12	-10.8	6.58	0.912	ns
5	trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-1.24	-9.94	7.46	0.98	ns
6	trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	5.15	-3.55	13.9	0.393	ns
7	trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	6.03	-2.67	14.7	0.259	ns
8	trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	0.88	-7.59	9.35	0.992	ns

PFV (peso fresco vástago)

Call:

lm(formula = PFV ~ trat.jat * trat.end, data = jacaranda)

ANOVA <- aov(PFV.jac.model)

summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	47.94	47.94	19.972	8.73B05 ***
trat.end	1	20.44	20.44	8.515	0.0063 **
trat.jat:trat.end	1	3.23	3.23	1.344	0.2547
Residuals	33	79.22	2.40		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	-2.28	-3.31	-1.24	0.0000873	****
2 trat.end	A	B	0	1.49	0.451	2.53	0.00632	**
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-1.68	-3.72	0.357	0.136	ns
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	2.07	0.141	3.99	0.0316	*
5 trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-0.799	-2.72	1.13	0.679	ns
6 trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	3.75	1.76	5.73	0.000079	****
7 trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	0.880	-1.11	2.87	0.633	ns
8 trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	-2.86	-4.74	-0.991	0.00125	**

PFR (Peso Fresco raíz)

Call:

lm(formula = PFR ~ trat.jat * trat.end, data = jacaranda)

ANOVA <- aov(PFR.jac.model)

summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	18.77	18.771	13.811	0.000747 ***
trat.end	1	5.13	5.128	3.773	0.060657 .
trat.jat:trat.end	1	0.09	0.088	0.065	0.800569
Residuals	33	44.85	1.359		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	-1.43	-2.21	-0.645	0.000747	***
2 trat.end	A	B	0	0.747	-0.0357	1.53	0.0608	ns
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-1.55	-3.09	-0.0208	0.046	*
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	0.652	-0.796	2.10	0.62	ns
5 trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-0.705	-2.15	0.744	0.56	ns
6 trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	2.21	0.710	3.70	0.00188	**
7 trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	0.848	-0.647	2.34	0.429	ns
8 trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	-1.36	-2.77	0.0533	0.0628	ns

PSV (Peso seco vástago)

Call:

lm(formula = PSV ~ trat.jat * trat.end, data = jacaranda)

ANOVA <- aov(PSV.jac.model) #(sin outliers)

summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	7.619	7.619	17.646	0.000199 ***
trat.end	1	2.211	2.211	5.121	0.030565 *
trat.jat:trat.end	1	0.102	0.102	0.237	0.629796
Residuals	32	13.816	0.432		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	-0.921	-1.37	-0.475	0.000199	***
2 trat.end	A	B	0	0.495	0.0487	0.941	0.0308	*
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-0.843	-1.68	-0.00366	0.0487	*
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	0.609	-0.256	1.47	0.245	ns
5 trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-0.447	-1.27	0.371	0.46	ns
6 trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	1.45	0.587	2.32	0.000409	***
7 trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	0.395	-0.423	1.21	0.564	ns
8 trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	-1.06	-1.90	-0.212	0.00961	**

PSR (peso seco raíz)

Call:

lm(formula = PSR ~ trat.jat * trat.end, data = jacaranda)

ANOVA <- aov(PSR.jac.model)

summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(F)
trat.jat	1	1.939	1.9389	12.783	0.00114 **
trat.end	1	0.274	0.2738	1.805	0.18851
trat.jat:trat.end	1	0.000	0.0000	0.000	0.98734

Residuals 32 4.854 0.1517

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

tukey_hsd(ANOVA)

A tibble: 8 x 9

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr	<chr	<chr	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<dbl	<chr
1 trat.jat	A	B	0	-0.465	-0.730	-0.200	0.00114	**
2 trat.end	A	B	0	0.174	-0.0903	0.439	0.189	ns
3 trat.jat:trat.end	A:A	B:A	0	-0.477	-0.974	0.0207	0.0642	ns
4 trat.jat:trat.end	A:A	A:B	0	0.172	-0.340	0.685	0.799	ns
5 trat.jat:trat.end	A:A	B:B	0	-0.3	-0.785	0.185	0.352	ns
6 trat.jat:trat.end	B:A	A:B	0	0.649	0.136	1.16	0.00867	**
7 trat.jat:trat.end	B:A	B:B	0	0.177	-0.308	0.661	0.758	ns
8 trat.jat:trat.end	A:B	B:B	0	-0.472	-0.973	0.0280	0.0699	ns

Análisis de hongos rizoféricos en la fase respuesta

Análisis de las UFC rizoféricas asociadas a Jatropha curcas

MEA

glm.nb(formula = UFC ~ trat.jat * trat.end, data = UFCJc, init.theta = 3.49588694, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.2259	-0.8707	-0.3663	0.4299	2.4043

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	1.3863	0.1495	9.276	< 2e-16 ***
trat.jatB	0.8459	0.1951	4.335	1.46e-05 ***
trat.endB	1.2384	0.1915	6.466	1.00e-10 ***
trat.jatB:trat.endB	-1.1365	0.2602	-4.367	1.26e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(3.4959) family taken to be 1)

Null deviance: 140.920 on 98 degrees of freedom
Residual deviance: 98.111 on 95 degrees of freedom
AIC: 603.76

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 3.496
Std. Err.: 0.675

2 x log-likelihood: -593.758

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: UFC

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.jat	2.265893	97	-629.7084				
2	trat.jat * trat.end	3.495887	95	-593.7575	1 vs 2	2	35.9509	1.560854e-08

DRBC

```
glm.nb(formula = UFCdrbc ~ trat.jat + trat.end, data = UFCdJc,  
init.theta = 2.433858684, link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.1929	-1.1426	-0.2298	0.5127	2.0165

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	0.9141	0.1510	6.052	1.43e-09 ***
trat.jatB	0.3795	0.1644	2.308	0.02101 *
trat.endB	0.4974	0.1647	3.019	0.00253 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(2.4339) family taken to be 1)

Null deviance: 132.39 on 99 degrees of freedom
Residual deviance: 118.54 on 97 degrees of freedom
AIC: 489.19

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 2.434
Std. Err.: 0.628

2 x log-likelihood: -481.185

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: UFCdrbc

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.jat	2.067420	98	-489.8672				
2	trat.jat + trat.end	2.433859	97	-481.1853	1 vs 2	1	8.681906	0.003213848

Solubilizadores de P

```
glm(formula = Solub ~ trat.jat + trat.end, family = poisson,  
data = UFCsol)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.8513	-0.6287	-0.3941	-0.2910	2.0996

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-2.5556	0.6045	-4.228	2.36e-05 ***
trat.jatB	-0.6061	0.5075	-1.194	0.2324
trat.endB	1.5404	0.6362	2.421	0.0155 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 65.792 on 99 degrees of freedom
Residual deviance: 56.576 on 97 degrees of freedom
AIC: 93.804

Number of Fisher Scoring iterations: 6

```
##Parametro de sobredispersión  
e1 <- resid(modelo1, type = "pearson")  
dispersion <- sum(e1^2) / (modelo1$df.res)  
dispersion  
[1] 0.9643601
```

Análisis de las UFC de la rizósfera asociada a Jacaranda mimosifolia (segunda generación)

MEA

```
glm.nb(formula = UFC ~ trat.jat, data = UFC, init.theta = 3.36632549,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.8689	-0.8770	-0.3877	0.2020	2.9518

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2.97451	0.08344	35.647	< 2e-16 ***
trat.jatB	-0.63849	0.12181	-5.242	1.59e-07 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
##Parametro de sobredispersión m1  
e1 <- resid(m1, type = "pearson")  
dispersion <- sum(e1^2) / (m1$df.res)  
dispersion  
[1] 1.382081
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: UFC

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 2.570068	99	-715.5119				
2	trat.jat 3.366325	98	-691.1664	1 vs 2	1	24.34553	8.05133e-07

DRBC

glm.nb(formula = UFC ~ trat.jat, data = UFCdrbc, init.theta = 0.9279607625, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.3771	-0.9969	-0.6152	-0.1085	2.4789

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(z)
(Intercept)	2.9210	0.1504	19.417	< 2e-16 ***
trat.jatB	-1.4081	0.2204	-6.388	1.68e-10 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(0.928) family taken to be 1)

Null deviance: 151.26 on 99 degrees of freedom
Residual deviance: 112.54 on 98 degrees of freedom
AIC: 662.08

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 0.928
Std. Err.: 0.141

2 x log-likelihood: -656.079

```
##Parametro de sobredispersión m1
e1 <- resid(m1, type = "pearson")
dispersion <- sum(e1^2) / (m1$df.res)
dispersion
[1] 1.494822
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: UFC

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.6695169	99	-689.1910				
2	trat.jat 0.9279608	98	-656.0792	1 vs 2	1	33.11181	8.70086e-09

Solubilizadores de P

```
glm.nb(formula = Solub ~ trat.jat, data = UFCsol, init.theta = 2.071412449,
link = log)
```

Deviance Residuals:

```
   Min      1Q  Median      3Q      Max
-1.29827 -0.55520 -0.55520 -0.03228  2.28171
```

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  0.03922   0.16996   0.231   0.817
trat.jatB   -1.87180   0.40440  -4.629 3.68e-06 ***
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

(Dispersion parameter for Negative Binomial(2.0714) family taken to be 1)

```
Null deviance: 112.388 on 99 degrees of freedom
Residual deviance: 83.611 on 98 degrees of freedom
AIC: 192.49
```

Number of Fisher Scoring iterations: 1

```
Theta: 2.07
Std. Err.: 1.53
```

2 x log-likelihood: -186.489

```
##Parametro de sobredispersión m1
e1 <- resid(m1, type = "pearson")
dispersion <- sum(e1^2) / (m1$df.res)
dispersion
[1] 0.9729676
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Solub

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.6819023	99	-211.0110			
2 trat.jat	2.0714124	98	-186.4893	1 vs 2	1 24.52174	7.347592e-07

Análisis de la colonización micorrícica

Micorrización en Jatropha curcas (T2)

Micorrización Total

```
> library("MASS")
> m2 <- glm.nb(Total ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> summary(m2)
```

Call:
glm.nb(formula = Total ~ Jatropha curcas * Endofito, data = data, na.action = na.omit,
init.theta = 4.044945424, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.93152	-0.49759	0.02401	0.45437	1.66166

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	4.7292	0.2263	20.898	<2e-16 ***
Jatropha curcasB	0.2694	0.3194	0.844	0.3989
EndofitoB	-0.7255	0.3230	-2.246	0.0247 *
Jatropha curcasB:EndofitoB	-0.5943	0.4578	-1.298	0.1943

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(4.0449) family taken to be 1)

Null deviance: 41.956 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 21.123 on 16 degrees of freedom
AIC: 210.77

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 4.04
Std. Err.: 1.34

```
2 x log-likelihood: -200.77
> #parametro de sobredispersión
> e2 <- resid(m2, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e2^2) / (m2$df.res)
> dispersion
[1] 0.91953
```

Para las comparaciones múltiples creamos la variable JE

```
> JE <- interaction(Jatropha curcas, Endofito, drop = TRUE)
> m3 <- glm.nb(Total ~ JE, data=data, na.action=na.omit)
> summary(m3)
```

Call:
glm.nb(formula = Total ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
init.theta = 4.044945424, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.93152	-0.49759	0.02401	0.45437	1.66166

Coefficients:

```

      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  4.7292    0.2263 20.898 < 2e-16 ***
JEB.A        0.2694    0.3194  0.844 0.39894
JEA.B       -0.7255    0.3230 -2.246 0.02469 *
JEB.B       -1.0503    0.3251 -3.231 0.00124 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

(Dispersion parameter for Negative Binomial(4.0449) family taken to be 1)

```

Null deviance: 41.956 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 21.123 on 16 degrees of freedom
AIC: 210.77

```

Number of Fisher Scoring iterations: 1

```

      Theta: 4.04
      Std. Err.: 1.34

```

```

2 x log-likelihood: -200.77
> Comparacion <- glht(m3, linfct = mcp(JE = "Tukey"))
> summary(Comparacion)

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```

Fit: glm.nb(formula = Total ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
init.theta = 4.044945424, link = log)

```

Linear Hypotheses:

```

      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
B.A - A.A == 0  0.2694    0.3194  0.844 0.83363
A.B - A.A == 0 -0.7255    0.3230 -2.246 0.11109
B.B - A.A == 0 -1.0503    0.3251 -3.231 0.00656 **
A.B - B.A == 0 -0.9949    0.3223 -3.087 0.01087 *
B.B - B.A == 0 -1.3197    0.3245 -4.067 < 0.001 ***
B.B - A.B == 0 -0.3249    0.3280 -0.990 0.75490

```

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

```

> A0 <- glm.nb (Total ~ 1, data=data, na.action=na.omit)
> A4 <- glm.nb(Total ~ Jatropha curcas*Endofito,data=data, na.action=na.omit)
> A3 <- glm.nb(Total ~ Jatropha curcas, data=data, na.action=na.omit)
> A2 <- glm.nb(Total ~ Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> anova(A0,A4, test="Chisq")

```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Total

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.
1	1	2.008440	19	-215.2587			

```
2 Jatropha curcas * Endofito 4.044945    16    -200.7700 1 vs 2    3 14.48866
  Pr(Chi)
1
2 0.002310119
```

```
> anova(A0,A3, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

```
Response: Total
  Model  theta Resid. df  2 x log-lik.  Test  df LR stat. Pr(Chi)
1      1 2.008440    19    -215.2587
2 Jatropha curcas 2.019562    18    -215.1365 1 vs 2    1 0.1221633 0.7267 NO
SIGNIFICATIVO
```

```
> anova(A0,A2, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

```
Response: Total
  Model  theta Resid. df  2 x log-lik.  Test  df LR stat.
1      1 2.008440    19    -215.2587
2 Endofito 3.721648    18    -202.3917 1 vs 2    1 12.86696
  Pr(Chi)
1
2 0.0003344338
```

Arbúsculos

```
Call: glm(propA ~ Jatropha curcas*Endofito, data = data, weights = Total,family =
binomial)
> summary(m3)
```

```
Call:
glm(formula = propA ~ Jatropha curcas * Endofito, family = binomial,
    data = data, weights = Total)
```

```
Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-10.2170  -2.8416   0.5801   1.6436   5.0872
```

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -0.71442   0.08949  -7.984 1.42e-15 ***
Jatropha curcasB    0.18701   0.11743   1.593  0.111
EndofitoB         -0.80986   0.18127  -4.468 7.91e-06 ***
Jatropha curcasB:EndofitoB 1.72593   0.24417   7.069 1.56e-12 ***
```

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
```

```
Null deviance: 325.61 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 234.17 on 16 degrees of freedom
```

AIC: 316.98

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```
> #parametro de sobredispersión
> e3 <- resid(m3, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e3^2) / (m3$df.res)
> dispersion
[1] 11.09718
> JE <- interaction(Jatropha curcas, Endofito, drop = TRUE)
> m4 <- glm(propA ~ JE, data = data, weights = Total, family = binomial)
> summary(m4)
```

Call:

```
glm(formula = propA ~ JE, family = binomial, data = data, weights = Total)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-10.2170	-2.8416	0.5801	1.6436	5.0872

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.71442	0.08949	-7.984	1.42e-15 ***
JEB.A	0.18701	0.11743	1.593	0.111
JEA.B	-0.80986	0.18127	-4.468	7.91e-06 ***
JEB.B	1.10308	0.17024	6.479	9.20e-11 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 325.61 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 234.17 on 16 degrees of freedom
AIC: 316.98

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```
> Comparacion <- glht(m4, linfct = mcp(JE = "Tukey"))
> A4 <- glm(propA ~ Jatropha curcas*Endofito, data = data, weights = Total, family = binomial)
> A3 <- glm(propA ~ Jatropha curcas, data = data, weights = Total, family = binomial)
> A2 <- glm(propA ~ Endofito, data = data, weights = Total, family = binomial)
> A0 <- glm(propA ~ 1, data = data, weights = Total, family = binomial)
> anova(A0, A4, test = "Chisq")
Analysis of Deviance Table
```

Model 1: propA ~ 1

Model 2: propA ~ Jatropha curcas * Endofito

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	19	325.61			
2	16	234.17	3	91.437	< 2.2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> anova(A0,A3, test="Chisq")
Analysis of Deviance Table
```

```
Model 1: propA ~ 1
Model 2: propA ~ Jatropha curcas
  Resid. Df Resid. Dev Df Deviance Pr(>Chi)
1     19   325.61
2     18   287.91 1   37.695 8.27e-10 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> anova(A0,A2, test="Chisq")
Analysis of Deviance Table
```

```
Model 1: propA ~ 1
Model 2: propA ~ Endofito
  Resid. Df Resid. Dev Df Deviance Pr(>Chi)
1     19   325.61
2     18   325.61 1 0.0018281 0.9659
```

```
> Comparacion <- glht(m4, linfct = mcp(JE = "Tukey"))
> summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = propA ~ JE, family = binomial, data = data, weights = Total)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
B.A - A.A == 0	0.1870	0.1174	1.593	0.373
A.B - A.A == 0	-0.8099	0.1813	-4.468	<1e-04 ***
B.B - A.A == 0	1.1031	0.1702	6.479	<1e-04 ***
A.B - B.A == 0	-0.9969	0.1750	-5.695	<1e-04 ***
B.B - B.A == 0	0.9161	0.1636	5.600	<1e-04 ***
B.B - A.B == 0	1.9129	0.2141	8.936	<1e-04 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Vesículas

Call:

```
glm(formula = propV ~ Jatropha curcas * Endofito, family = binomial,
     data = data, weights = Total)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-8.4493	-1.8871	-0.2307	0.8292	6.2278

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -1.16083   0.09863 -11.770 < 2e-16 ***
Jatropha curcasB    1.21753   0.12300  9.898 < 2e-16 ***
EndofitoB        -1.61954   0.27587 -5.871 4.34e-09 ***
Jatropha curcasB:EndofitoB -0.08341   0.34464 -0.242  0.809
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 446.09 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 169.36 on 16 degrees of freedom
AIC: 241.56

Number of Fisher Scoring iterations: 5
`> e3 <- resid(m3, type = "pearson")`

`> n <- nrow(data)`

`> dispersion <- sum(e3^2) / (m3$df.res)`

`> dispersion`

[1] 8.392993 CHAN. No da nada lindo pero teóricamente en una binomial no debería tener dipersión....

`> m4 <- glm(propV ~ JE, data = data, weights = Total, family = binomial)`

`> summary(m4)`

Call:

`glm(formula = propV ~ JE, family = binomial, data = data, weights = Total)`

Deviance Residuals:

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-8.4493 -1.8871 -0.2307  0.8292  6.2278
```

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.16083   0.09863 -11.770 < 2e-16 ***
JEB.A       1.21753   0.12300  9.898 < 2e-16 ***
JEA.B      -1.61954   0.27587 -5.871 4.34e-09 ***
JEB.B      -0.48542   0.21680 -2.239  0.0252 *
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 446.09 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 169.36 on 16 degrees of freedom
AIC: 241.56

Number of Fisher Scoring iterations: 5

`> Comparacion <- glht(m4, linfct = mcp(JE = "Tukey"))`

`> summary(Comparacion)`

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = propV ~ JE, family = binomial, data = data, weights = Total)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
B.A - A.A == 0	1.2175	0.1230	9.898	< 0.001 ***
A.B - A.A == 0	-1.6195	0.2759	-5.871	< 0.001 ***
B.B - A.A == 0	-0.4854	0.2168	-2.239	0.10268
A.B - B.A == 0	-2.8371	0.2679	-10.589	< 0.001 ***
B.B - B.A == 0	-1.7029	0.2066	-8.243	< 0.001 ***
B.B - A.B == 0	1.1341	0.3219	3.523	0.00223 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> A4 <- glm(propV ~ Jatropha curcas*Endofito, data = data, weights = Total,family = binomial)
```

```
> A3 <- glm(propV ~ Jatropha curcas, data = data, weights = Total,family = binomial)
```

```
> A2 <- glm(propV ~ Endofito, data = data, weights = Total,family = binomial)
```

```
> A0 <- glm(propV ~ 1, data=data,weights = Total,family = binomial)
```

```
> anova(A0,A4, test="Chisq")
```

Analysis of Deviance Table

Model 1: propV ~ 1

Model 2: propV ~ Jatropha curcas * Endofito

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	19	446.09			
2	16	169.36	3	276.73	< 2.2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> anova(A0,A3, test="Chisq")
```

Analysis of Deviance Table

Model 1: propV ~ 1

Model 2: propV ~ Jatropha curcas

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	19	446.09			
2	18	303.15	1	142.94	< 2.2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> anova(A0,A2, test="Chisq")
```

Analysis of Deviance Table

Model 1: propV ~ 1

Model 2: propV ~ Endofito

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	Pr(>Chi)
1	19	446.09			
2	18	287.69	1	158.4	< 2.2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Coils

```
glm(formula = Coil ~ Jatropha curcas * Endofito, family = poisson, data = data)
```

Deviance Residuals:

```
  Min    1Q  Median    3Q   Max
-3.4641 -1.4142 -0.4349  0.1176  2.8451
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  2.882e-16  4.472e-01  0.000 1.000000
Jatropha curcasB  1.792e+00  4.830e-01  3.709 0.000208 ***
EndofitoB      -1.830e+01  2.557e+03 -0.007 0.994289
Jatropha curcasB:EndofitoB  1.600e+01  2.557e+03  0.006 0.995007
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

```
Null deviance: 103.894 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 48.235 on 16 degrees of freedom
AIC: 78.854
```

Number of Fisher Scoring iterations: 16

```
> #parametro de sobredispersión
> e1 <- resid(m1, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> k <- length(fixef(m1)) + 1 #parametros estimados
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e1^2) / (m1$df.res)
> dispersion
[1] 3
> m2 <- glm.nb(Coil ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> summary(m2)
```

Call:

```
glm.nb(formula = Coil ~ Jatropha curcas * Endofito, data = data, na.action = na.omit,
  init.theta = 0.6095335182, link = log)
```

Deviance Residuals:

```
  Min    1Q  Median    3Q   Max
-1.70462 -0.95751 -0.14032  0.07975  1.44468
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -2.324e-15  7.267e-01  0.000 1.0000
Jatropha curcasB  1.792e+00  9.432e-01  1.900 0.0575 .
EndofitoB      -1.930e+01  4.216e+03 -0.005 0.9963
Jatropha curcasB:EndofitoB  1.700e+01  4.216e+03  0.004 0.9968
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(0.6095) family taken to be 1)

Null deviance: 30.651 on 19 degrees of freedom
 Residual deviance: 14.397 on 16 degrees of freedom
 AIC: 62.649

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 0.610
 Std. Err.: 0.415

```
2 x log-likelihood: -52.649
> #parametro de sobredispersión
> e2 <- resid(m2, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e2^2) / (m2$df.res)
> dispersion
[1] 0.7720033 BIEN!!
# según Bates, entre 0.75 y 1.4 no hay sobre o sub-dispersión
> Comparacion <- glht(m3, linfct = mcp(JE = "Tukey"))
> summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm.nb(formula = Coil ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
 init.theta = 0.6095335182, link = log)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
B.A - A.A == 0	1.7918	0.9432	1.900	0.1877
A.B - A.A == 0	-19.3026	4215.7113	-0.005	1.0000
B.B - A.A == 0	-0.5108	1.0907	-0.468	0.9588
A.B - B.A == 0	-21.0943	4215.7113	-0.005	1.0000
B.B - B.A == 0	-2.3026	1.0114	-2.277	0.0802
B.B - A.B == 0	18.7918	4215.7113	0.004	1.0000

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
 (Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> A4 <- glm.nb(Coil ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> A3 <- glm.nb(Coil ~ Jatropha curcas, data=data, na.action=na.omit)
> A2 <- glm.nb(Coil ~ Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> A0 <- glm.nb(Coil ~ 1, data=data, na.action=na.omit)
> anova(A0,A4, test="Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Coil

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df
1	0.1855039	19	-63.08898		
2 Jatropha curcas * Endofito	0.6095335	16	-52.64950	1 vs 2	3

LR stat. Pr(Chi)

```

1
2 10.43948 0.01517711
> anova(A0,A3, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

Response: Coil

```

Model theta Resid. df 2 x log-lik. Test df LR stat.
1 1 0.1855039 19 -63.08898
2 Jatropha curcas 0.2657674 18 -60.14794 1 vs 2 1 2.941039
Pr(Chi)

```

```

1
2 0.08635517
> anova(A0,A2, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

Response: Coil

```

Model theta Resid. df 2 x log-lik. Test df LR stat.
1 1 0.1855039 19 -63.08898
2 Endofito 0.3342307 18 -58.23203 1 vs 2 1 4.856949
Pr(Chi)

```

```

1
2 0.02753499

```

Micorrización en *Jacaranda mimosifolia*

Micorrización total

Call:

```

glm.nb(formula = Total ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
init.theta = 5.595303958, link = log)

```

Deviance Residuals:

```

Min 1Q Median 3Q Max
-2.0168 -0.9438 0.1623 0.4241 1.9267

```

Coefficients:

```

Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) 4.59107 0.19435 23.622 < 2e-16 ***
JEB.A -0.01636 0.27492 -0.060 0.95255
JEA.B -0.46394 0.27702 -1.675 0.09399 .
JEB.B -0.91224 0.28030 -3.255 0.00114 **

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(5.5953) family taken to be 1)

```

Null deviance: 34.265 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 20.828 on 16 degrees of freedom
AIC: 201.37

```

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 5.60
Std. Err.: 1.91

```
2 x log-likelihood: -191.368  
> library(multcomp)  
> Comparacion <- glht(m3, linfct = mcp(JE = "Tukey"))  
> summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm.nb(formula = Total ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
init.theta = 5.595303958, link = log)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
B.A - A.A == 0	-0.01636	0.27492	-0.060	0.99992
A.B - A.A == 0	-0.46394	0.27702	-1.675	0.33709
B.B - A.A == 0	-0.91224	0.28030	-3.255	0.00603 **
A.B - B.A == 0	-0.44758	0.27709	-1.615	0.36986
B.B - B.A == 0	-0.89588	0.28036	-3.195	0.00736 **
B.B - A.B == 0	-0.44831	0.28243	-1.587	0.38578

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> A4 <- glm.nb(Total ~ Jatropha curcas*Endofito,data=data, na.action=na.omit)  
> A3 <- glm.nb(Total ~ Jatropha curcas, data=data, na.action=na.omit)  
> A2 <- glm.nb(Total ~ Endofito, data=data, na.action=na.omit)  
> A0 <- glm.nb (Total ~ 1, data=data, na.action=na.omit)
```

```
> anova(A0,A4, test="Chisq")  
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.
1	3.300590	19	-201.7234			
2 Jatropha curcas * Endofito	5.595304	16	-191.3676	1 vs 2	3	10.35581

Pr(Chi)

1	
2	0.0157716

```
> anova(A0,A3, test="Chisq")  
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	3.300590	19	-201.7234				
2 Jatropha curcas	3.368738	18	-201.3059	1 vs 2	1	0.4175111	0.5181816

```
> anova(A0,A2, test="Chisq")  
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Total

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.
1	1 3.300590	19	-201.7234			
2	Endofito 4.946927	18	-193.7393	1 vs 2	1	7.984126

Pr(Chi)

1	
2	0.004718928

Arbúsculos

Call:

```
glm.nb(formula = Arbuscule ~ JE, data = data, na.action = na.omit,  
init.theta = 3.038179871, link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.8857	-0.8274	-0.1363	0.3836	1.6763

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.6270	0.2667	13.598	<2e-16 ***
JEB.A	-0.6115	0.3831	-1.596	0.1105
JEA.B	-0.6413	0.3835	-1.672	0.0945 .
JEB.B	-0.4658	0.3814	-1.221	0.2220

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(3.0382) family taken to be 1)

Null deviance: 24.600 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 20.739 on 16 degrees of freedom
AIC: 169.8

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 3.04
Std. Err.: 1.04

```
2 x log-likelihood: -159.798  
> Comparacion <- glht(m3, linfct = mcp(JE = "Tukey"))  
> summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: glm.nb(formula = Arbuscule ~ JE, data = data, na.action = na.omit,  
init.theta = 3.038179871, link = log)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
B.A - A.A == 0	-0.61147	0.38312	-1.596	0.381

```

A.B - A.A == 0 -0.64132  0.38351 -1.672  0.338
B.B - A.A == 0 -0.46576  0.38138 -1.221  0.613
A.B - B.A == 0 -0.02985  0.38931 -0.077  1.000
B.B - B.A == 0  0.14571  0.38722  0.376  0.982
B.B - A.B == 0  0.17556  0.38760  0.453  0.969
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

```

> A4 <- glm.nb(Arbuscule ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> A3 <- glm.nb(Arbuscule ~ Jatropha curcas, data=data, na.action=na.omit)
> A2 <- glm.nb(Arbuscule ~ Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> A0 <- glm.nb(Arbuscule ~ 1, data=data, na.action=na.omit)

```

```

> anova(A0,A4, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

```

Response: Arbuscule
      Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat.
1          1 2.529972    19   -163.3464
2 Jatropha curcas * Endofito 3.038180    16   -159.7982 1 vs 2  3 3.548283
  Pr(Chi)
1
2 0.3145538

```

```

> anova(A0,A3, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

```

Response: Arbuscule
      Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat. Pr(Chi)
1          1 2.529972    19   -163.3464
2 Jatropha curcas 2.637264    18   -162.5212 1 vs 2  1 0.8252593 0.363647

```

```

> anova(A0,A2, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

```

Response: Arbuscule
      Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat. Pr(Chi)
1          1 2.529972    19   -163.3464
2 Endofito 2.658631    18   -162.3617 1 vs 2  1 0.9847189 0.3210365

```

Vesículas

Call:

```

glm(formula = Vesicle ~ Jatropha curcas * Endofito, family = poisson,
     data = data)

```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-6.4766	-2.1987	-0.3023	0.9704	4.6624

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.25810	0.08771	37.148	< 2e-16 ***
Jatropha curcasB	-0.03125	0.12502	-0.250	0.803
EndofitoB	-1.12986	0.17749	-6.366	1.94e-10 ***
Jatropha curcasB:EndofitoB	-0.24068	0.26587	-0.905	0.365

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 242.44 on 19 degrees of freedom

Residual deviance: 134.81 on 16 degrees of freedom

AIC: 221.89

Number of Fisher Scoring iterations: 5

```
> #parametro de sobredispersión
> e1 <- resid(m1, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e1^2) / (m1$df.res)
> dispersion
[1] 7.148256
```

Call:

```
glm(formula = Vesicle ~ Jatropha curcas * Endofito, family = poisson,
     data = data)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-6.4766	-2.1987	-0.3023	0.9704	4.6624

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.25810	0.08771	37.148	< 2e-16 ***
Jatropha curcasB	-0.03125	0.12502	-0.250	0.803
EndofitoB	-1.12986	0.17749	-6.366	1.94e-10 ***
Jatropha curcasB:EndofitoB	-0.24068	0.26587	-0.905	0.365

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 242.44 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 134.81 on 16 degrees of freedom
AIC: 221.89

Number of Fisher Scoring iterations: 5

```
> #parametro de sobredispersión
> e1 <- resid(m1, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e1^2) / (m1$df.res)
> dispersion
[1] 7.148256
> m2 <- glm.nb(Vesicle ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> summary(m2)
```

Call:

```
glm.nb(formula = Vesicle ~ Jatropha curcas * Endofito, data = data,
na.action = na.omit, init.theta = 1.709711549, link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.44691	-0.72765	-0.09387	0.35348	1.28722

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
--	----------	------------	---------	----------

```

(Intercept)    3.25810  0.35309  9.227 <2e-16 ***
Jatropha curcasB  -0.03125  0.49959 -0.063  0.9501
EndofitoB      -1.12986  0.51523 -2.193  0.0283 *
Jatropha curcasB:EndofitoB -0.24068  0.73390 -0.328  0.7429

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.7097) family taken to be 1)

Null deviance: 35.940 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 24.648 on 16 degrees of freedom
AIC: 154.67

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.710
Std. Err.: 0.692

```

2 x log-likelihood: -144.668
> #parametro de sobredispersión
> e2 <- resid(m2, type = "pearson")
> n <- nrow(data)
> #Estadístico de dispersión
> dispersion <- sum(e2^2) / (m2$df.res)
> dispersion
[1] 0.8725771

> m3 <- glm.nb(Vesicle ~ JE, data=data, na.action=na.omit)
> summary(m3)

```

Call:
glm.nb(formula = Vesicle ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
init.theta = 1.709711549, link = log)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.44691	-0.72765	-0.09387	0.35348	1.28722

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	3.25810	0.35309	9.227	< 2e-16 ***
JEB.A	-0.03125	0.49959	-0.063	0.95012
JEA.B	-1.12986	0.51523	-2.193	0.02831 *
JEB.B	-1.40180	0.52240	-2.683	0.00729 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.7097) family taken to be 1)

Null deviance: 35.940 on 19 degrees of freedom
Residual deviance: 24.648 on 16 degrees of freedom
AIC: 154.67

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.710
Std. Err.: 0.692

```
2 x log-likelihood: -144.668  
> Comparacion <- glht(m3, linfct = mcp(JE = "Tukey"))  
> summary(Comparacion)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: glm.nb(formula = Vesicle ~ JE, data = data, na.action = na.omit,  
init.theta = 1.709711549, link = log)
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
B.A - A.A == 0	-0.03125	0.49959	-0.063	0.9999
A.B - A.A == 0	-1.12986	0.51523	-2.193	0.1250
B.B - A.A == 0	-1.40180	0.52240	-2.683	0.0364 *
A.B - B.A == 0	-1.09861	0.51546	-2.131	0.1430
B.B - B.A == 0	-1.37055	0.52263	-2.622	0.0434 *
B.B - A.B == 0	-0.27193	0.53760	-0.506	0.9577

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> A4 <- glm.nb(Vesicle ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)  
> A3 <- glm.nb(Vesicle ~ Jatropha curcas, data=data, na.action=na.omit)  
> A2 <- glm.nb(Vesicle ~ Endofito, data=data, na.action=na.omit)  
> A0 <- glm.nb(Vesicle ~ 1, data=data, na.action=na.omit)
```

```
> anova(A0,A4, test="Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Vesicle

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df
1	1 0.9961165	19	-153.3226		
2 Jatropha curcas * Endofito	1.7097115	16	-144.6679	1 vs 2	3

LR stat. Pr(Chi)

1	
2 8.65471 0.03425205	

```
> anova(A0,A3, test="Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Vesicle

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.
1	1 0.9961165	19	-153.3226			
2 Jatropha curcas	0.9979859	18	-153.2888	1 vs 2	1	0.03387378

Pr(Chi)

1	
2 0.8539756	

```
> anova(A0,A2, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

```
Response: Vesicle
  Model  theta Resid. df  2 x log-lik.  Test  df LR stat.
1     1 0.9961165    19   -153.3226
2 Endofito 1.6806976    18   -144.9256 1 vs 2    1 8.397052
  Pr(Chi)
1
2 0.003758301
```

Coils

```
Call:
glm.nb(Coil ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
summary(m2)
```

```
#parametro de sobredispersión
e2 <- resid(m2, type = "pearson")
n <- nrow(data)
```

```
#Estadístico de dispersión
dispersion <- sum(e2^2) / (m2$df.res)
dispersion
#0.89!!!! # según Bates, entre 0.75 y 1.4 no hay sobre o sub-dispersión
```

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: glm.nb(formula = Coil ~ JE, data = data, na.action = na.omit,
  init.theta = 8.201088635, link = log)
```

Linear Hypotheses:

```
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
B.A - A.A == 0 0.7802 0.2862 2.726 0.0222 *
A.B - A.A == 0 -21.4773 4215.7112 -0.005 1.0000
B.B - A.A == 0 -2.6856 0.6363 -4.221 8.98e-05 ***
A.B - B.A == 0 -22.2575 4215.7112 -0.005 1.0000
B.B - B.A == 0 -3.4657 0.6265 -5.532 < 1e-05 ***
B.B - A.B == 0 18.7918 4215.7113 0.004 1.0000
```

```
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

```
> A4 <- glm.nb(Coil ~ Jatropha curcas*Endofito, data=data, na.action=na.omit)
> A3 <- glm.nb(Coil ~ Jatropha curcas, data=data, na.action=na.omit)
```

Warning messages:

```
1: In theta.ml(Y, mu, sum(w), w, limit = control$maxit, trace = control$trace > :
iteration limit reached
2: In sqrt(1/i) : Se han producido NaNs
3: In theta.ml(Y, mu, sum(w), w, limit = control$maxit, trace = control$trace > :
iteration limit reached
4: In sqrt(1/i) : Se han producido NaNs
> A2 <- glm.nb(Coil ~ Endofito, data=data, na.action=na.omit)
```

```
> A0 <- glm.nb(Coil ~ 1, data=data, na.action=na.omit)
Warning messages:
1: In theta.ml(Y, mu, sum(w), w, limit = control$maxit, trace = control$trace > :
  iteration limit reached
2: In sqrt(1/i) : Se han producido NaNs
3: In theta.ml(Y, mu, sum(w), w, limit = control$maxit, trace = control$trace > :
  iteration limit reached
4: In sqrt(1/i) : Se han producido NaNs
```

```
> anova(A0,A4, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

```
Response: Coil
      Model      theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df
1          1 1.089936e+05    19   -271.98936
2 Jatropha curcas * Endofito 8.201089e+00    16   -76.55908 1 vs 2    3
  LR stat. Pr(Chi)
1
2 195.4303    0
```

```
> anova(A0,A3, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

```
Response: Coil
      Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat.
1      1 108993.6    19   -271.9894
2 Jatropha curcas 103032.2    18   -250.2812 1 vs 2    1 21.70816
  Pr(Chi)
1
2 3.174382e-06
```

```
> anova(A0,A2, test="Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

```
Response: Coil
      Model      theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat.
1          1 1.089936e+05    19   -271.98936
2 Endofito 2.643031e+00    18   -85.19675 1 vs 2    1 186.7926
  Pr(Chi)
1
2    0
```


Anexo estadístico y filogenético del capítulo 3

Resultados del analisis molecular y filogenetico del capitulo 3

A continuación, en la figura 1 se presenta el árbol obtenido a partir del análisis filogenético realizado, utilizando el criterio de optimización de máxima parsimonia utilizando NONA v.2.0 (Goloboff 1997), incluyendo las 4 cepas de *Alternaria* provenientes del capítulo 1 (C1, C2, C3 y C4) y las 4 cepas recuperadas luego de los ensayos de inoculación (C2 i, C2ii, C2 iii y C2 viii). Se utilizaron 2000 repeticiones y un máximo de 10000 árboles. Para determinar el soporte de cada clado, se realizaron análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. Una secuencia de *Amanita muscaria* (AB096052) fue elegida como outgroup.

Los análisis filogenéticos corroboraron que la cepa C2 utilizada para los ensayos de inoculación, y las recuperadas luego a partir de las hojas de pepino inoculadas (C2 i, C2ii, C2 iii y C2 viii), están filogenéticamente relacionada con la cepa original (NsE+13, KR780620).

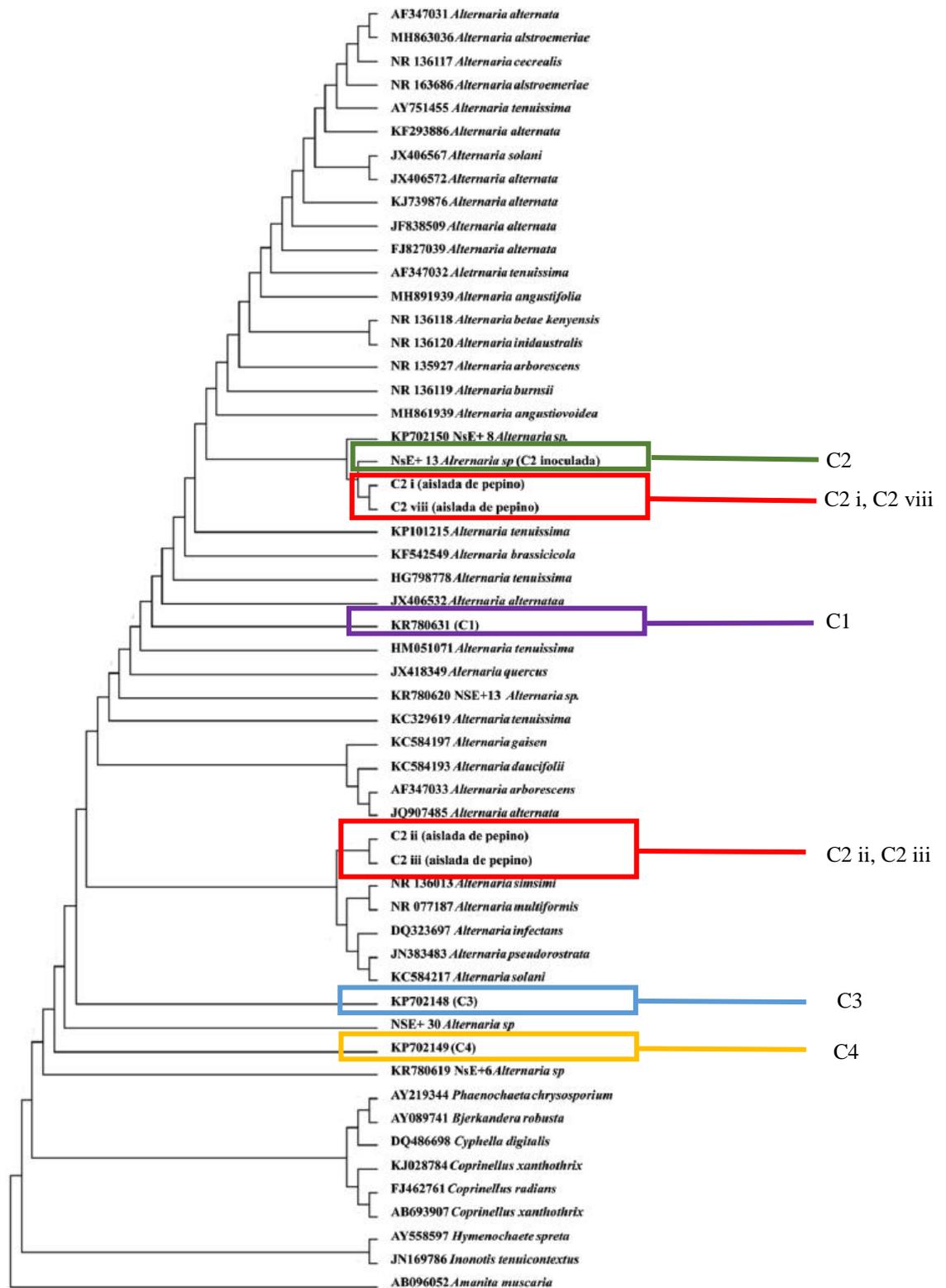


Figura 1: Árbol obtenido a partir del criterio de optimización de Máxima Parsimonia (regla de mayoría del 50%) basado en la región ITS/ITS2 producto de un set de datos de 157 secuencias, incorporando las secuencias de las cepas recuperadas luego de los ensayos de inoculación (C2 i, C2ii, C2 iii y C2 viii), la cepa C1 (KR7880621) la cepa C2(KR780620), la cepa C3 (KP702148) y la cepa C4 (KP702149).

Evaluacion del crecimiento de *Alternaria* en diferentes medios de cultivos

Medio

A= Agar Agua

B= Agar Malta

Aditivo:

A= adicionado con *Jatropha curcas*

B= sin *Jatropha curcas*

CEPA 1

```
> crec <- read.csv("crec_alt.txt")
> #Correr modelo y ver resultado
>
> model1 <- lm(C1 ~ medio * aditivo, data = crec)
> summary(model1)
```

Call:

```
lm(formula = C1 ~ medio * aditivo, data = crec)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-5.6	-2.4	0.2	1.9	6.4

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	48.400	1.549	31.242	9.05e-16 ***
medioB	-1.200	2.191	-0.548	0.591442
aditivoB	10.400	2.191	4.747	0.000219 ***
medioB:aditivoB	-2.000	3.098	-0.645	0.527754

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 3.464 on 16 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.7104, Adjusted R-squared: 0.6561
F-statistic: 13.08 on 3 and 16 DF, p-value: 0.0001423

```
> ANOVA <- aov(model1)
> summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
medio    1  24.2   24.2  2.017  0.175
aditivo  1 441.8  441.8 36.817 1.63e-05 ***
medio:aditivo 1   5.0   5.0  0.417  0.528
Residuals 16 192.0  12.0
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

>

```
> TukeyHSD(ANOVA)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

```
Fit: aov(formula = model1)
```

\$medio

diff	lwr	upr	p adj
------	-----	-----	-------

B-A -2.2 -5.484143 1.084143 0.1747725

\$aditivo

diff lwr upr p adj
B-A 9.4 6.115857 12.68414 1.63e-05

\$`medio:aditivo`

diff lwr upr p adj
B:A-A:A -1.2 -7.4681804 5.06818 0.9458230
A:B-A:A 10.4 4.1318196 16.66818 0.0011289
B:B-A:A 7.2 0.9318196 13.46818 0.0217185
A:B-B:A 11.6 5.3318196 17.86818 0.0003818
B:B-B:A 8.4 2.1318196 14.66818 0.0071823
B:B-A:B -3.2 -9.4681804 3.06818 0.4824090

```
> leveneTest( C1~medio*aditivo, data=crec)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3  1.1282 0.3673
  16
```

```
>
> aov_residuals<-residuals(object=model1)
> shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

data: aov_residuals
W = 0.98691, p-value = 0.9909

C2

```
> model1 <- lm(C2 ~ medio * aditivo, data = crec)
> summary(model1)
```

Call:

lm(formula = C2 ~ medio * aditivo, data = crec)

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-8.8	0.0	0.8	1.6	5.2

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	52.000	1.822	28.539	3.76e-15 ***
medioB	6.800	2.577	2.639	0.01787 *
aditivoB	24.000	2.577	9.314	7.32e-08 ***
medioB:aditivoB	-13.600	3.644	-3.732	0.00182 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4.074 on 16 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.8656, Adjusted R-squared: 0.8404
F-statistic: 34.35 on 3 and 16 DF, p-value: 3.338e-07

```
> ANOVA <- aov(model1)
```

```

> summary(ANOVA)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
medio    1  0.0    0.0   0.001 1.00000
aditivo   1 1479.2 1479.2  89.11 6.09e-08 ***
medio:aditivo 1 231.2 231.2  13.93 0.00182 **
Residuals 16 265.6  16.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
> TukeyHSD(ANOVA)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = model1)

$medio
  diff   lwr   upr p adj
B-A  0 -3.862651 3.862651  1

$aditivo
  diff   lwr   upr p adj
B-A 17.2 13.33735 21.06265 1e-07

$`medio:aditivo`
  diff   lwr   upr p adj
B:A-A:A 6.8 -0.5723324 14.1723324 0.0760317
A:B-A:A 24.0 16.6276676 31.3723324 0.0000004
B:B-A:A 17.2  9.8276676 24.5723324 0.0000289
A:B-B:A 17.2  9.8276676 24.5723324 0.0000289
B:B-B:A 10.4  3.0276676 17.7723324 0.0047610
B:B-A:B -6.8 -14.1723324  0.5723324 0.0760317

> leveneTest( C2~medio*aditivo, data=crec)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group 3  1.0429 0.4005
      16
>
> aov_residuals<-residuals(object=model1)
> shapiro.test(x=aov_residuals)
      Shapiro-Wilk normality test

data: aov_residuals
W = 0.86888, p-value = 0.01123

C3

Call:
lm(formula = C3 ~ medio * aditivo, data = crec)

Residuals:
  Min   1Q Median   3Q   Max
-7.6 -3.6 -0.6  3.2  8.8

```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	59.600	2.408	24.748	3.51e-14	***
medioB	2.000	3.406	0.587	0.565251	
aditivoB	13.200	3.406	3.876	0.001341	**
medioB:aditivoB	-19.600	4.817	-4.069	0.000892	***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 5.385 on 16 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.6448, Adjusted R-squared: 0.5782
F-statistic: 9.68 on 3 and 16 DF, p-value: 7e-04

>

>

> ANOVA <- aov(model1)

> summary(ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
medio	1	304.2	304.2	10.490	0.005141 **
aditivo	1	57.8	57.8	1.993	0.177169
medio:aditivo	1	480.2	480.2	16.559	0.000892 ***
Residuals	16	464.0	29.0		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

>

> TukeyHSD(ANOVA)

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = model1)

\$medio

	diff	lwr	upr	p adj
B-A	-7.8	-12.90541	-2.694592	0.005141

\$aditivo

	diff	lwr	upr	p adj
B-A	3.4	-1.705408	8.505408	0.1771688

\$`medio:aditivo`

	diff	lwr	upr	p adj
B:A-A:A	2.0	-7.744282	11.744282	0.9344944
A:B-A:A	13.2	3.455718	22.944282	0.0065993
B:B-A:A	-4.4	-14.144282	5.344282	0.5808239
A:B-B:A	11.2	1.455718	20.944282	0.0216277
B:B-B:A	-6.4	-16.144282	3.344282	0.2753167
B:B-A:B	-17.6	-27.344282	-7.855718	0.0004897

> leveneTest(C3~medio*aditivo, data=crec)

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

	Df	F value	Pr(>F)
group	3	0.3876	0.7635
	16		

> aov_residuals<-residuals(object=model1)

```
> shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
W = 0.95307, p-value = 0.4161
```

C4

Call:

```
lm(formula = C4 ~ medio * aditivo, data = crec)
```

Residuals:

```
Min 1Q Median 3Q Max
-14.0 -1.2 -0.4 2.9 8.0
```

Coefficients:

```
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) 51.200 2.404 21.296 3.63e-13 ***
medioB 9.600 3.400 2.824 0.01223 *
aditivoB 13.600 3.400 4.000 0.00103 **
medioB:aditivoB -6.400 4.808 -1.331 0.20184
---
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 5.376 on 16 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.6328, Adjusted R-squared: 0.5639
F-statistic: 9.19 on 3 and 16 DF, p-value: 0.0009057
```

```
> ANOVA <- aov(model1)
```

```
> summary(ANOVA)
```

```
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
medio 1 204.8 204.8 7.087 0.017045 *
aditivo 1 540.8 540.8 18.713 0.000522 ***
medio:aditivo 1 51.2 51.2 1.772 0.201838
Residuals 16 462.4 28.9
---
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
>
```

```
> TukeyHSD(ANOVA)
```

```
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = model1)
```

```
$medio
```

```
diff lwr upr p adj
B-A 6.4 1.303402 11.4966 0.0170448
```

```
$aditivo
```

```
diff lwr upr p adj
B-A 10.4 5.303402 15.4966 0.0005218
```

```
$`medio:aditivo`
```

```
diff lwr upr p adj
B:A-A:A 9.6 -0.1274674 19.32747 0.0537165
```

```

A:B-A:A 13.6 3.8725326 23.32747 0.0051230
B:B-A:A 16.8 7.0725326 26.52747 0.0007661
A:B-B:A 4.0 -5.7274674 13.72747 0.6495748
B:B-B:A 7.2 -2.5274674 16.92747 0.1895822
B:B-A:B 3.2 -6.5274674 12.92747 0.7835152

```

```

> leveneTest( C4~medio*aditivo, data=crec)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3 1.5508 0.2401
    16
>
> aov_residuals<-residuals(object=model1)
> shapiro.test(x=aov_residuals)

```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: aov_residuals
W = 0.92793, p-value = 0.1409

```

C5

```

Call:
lm(formula = C5 ~ medio * aditivo, data = crec)

```

```

Residuals:
  Min   1Q Median   3Q   Max
-4.4 -1.6 -0.4  1.6  7.6

```

```

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  43.600    1.257  34.686 < 2e-16 ***
medioB       17.600    1.778  9.901 3.16e-08 ***
aditivoB     8.800    1.778  4.950 0.000145 ***
medioB:aditivoB -5.600    2.514 -2.228 0.040612 *
---

```

```

Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

Residual standard error: 2.811 on 16 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9123,    Adjusted R-squared:  0.8958
F-statistic: 55.46 on 3 and 16 DF,  p-value: 1.125e-08

```

```

> ANOVA <- aov(model1)
> summary(ANOVA)
            Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
medio      1 1095.2  1095.2 138.633 2.71e-09 ***
aditivo    1  180.0   180.0  22.785 0.000207 ***
medio:aditivo 1   39.2    39.2   4.962 0.040612 *
Residuals 16  126.4    7.9
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
> TukeyHSD(ANOVA)

```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = model1)

```
$medio
  diff   lwr   upr p adj
B-A 14.8 12.13532 17.46468  0
```

```
$aditivo
  diff   lwr   upr  p adj
B-A  6 3.33532 8.66468 0.0002073
```

```
$`medio:aditivo`
  diff   lwr   upr  p adj
B:A-A:A 17.6 12.51414 22.68586 0.0000002
A:B-A:A  8.8  3.71414 13.88586 0.0007522
B:B-A:A 20.8 15.71414 25.88586 0.0000000
A:B-B:A -8.8 -13.88586 -3.71414 0.0007522
B:B-B:A  3.2 -1.88586  8.28586 0.3090751
B:B-A:B 12.0  6.91414 17.08586 0.0000252
```

```
>
> #evaluar homocedasticidad
> leveneTest( C5~medio*aditivo, data=crec)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3  0.5621 0.6477
  16
>
>
> #para ver si hay normalidad en los residuos
> aov_residuals<-residuals(object=model1)
> shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
W = 0.90152, p-value = 0.04404
```

C6

```
Call:
lm(formula = C6 ~ medio * aditivo, data = crec)
```

```
Residuals:
  Min   1Q Median   3Q   Max
-4.8  -1.4   0.4   1.6   5.2
```

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  40.800     1.077  37.882 < 2e-16 ***
medioB       17.600     1.523  11.555 3.55e-09 ***
aditivoB     8.400     1.523   5.515 4.71e-05 ***
```

```
medioB:aditivoB -12.800 2.154 -5.942 2.07e-05 ***
```

```
---
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 2.408 on 16 degrees of freedom  
Multiple R-squared: 0.9018, Adjusted R-squared: 0.8834  
F-statistic: 48.97 on 3 and 16 DF, p-value: 2.763e-08
```

```
> ANOVA <- aov(model1)
```

```
> summary(ANOVA)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)  
medio      1  627.2   627.2 108.138 1.59e-08 ***  
aditivo     1   20.0    20.0   3.448  0.0818 .  
medio:aditivo 1  204.8   204.8 35.310 2.07e-05 ***  
Residuals  16   92.8    5.8
```

```
---
```

```
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
>
```

```
> TukeyHSD(ANOVA)
```

```
Tukey multiple comparisons of means
```

```
95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = model1)
```

```
$medio
```

```
  diff    lwr    upr p adj  
B-A 11.2 8.916792 13.48321  0
```

```
$aditivo
```

```
  diff    lwr    upr  p adj  
B-A  2 -0.2832078 4.283208 0.0818246
```

```
$`medio:aditivo`
```

```
  diff    lwr    upr  p adj  
B:A-A:A 17.6 13.2422244 21.95777557 0.0000000  
A:B-A:A  8.4  4.0422244 12.75777557 0.0002490  
B:B-A:A 13.2  8.8422244 17.55777557 0.0000011  
A:B-B:A -9.2 -13.5577756 -4.84222443 0.0000919  
B:B-B:A -4.4 -8.7577756 -0.04222443 0.0474077  
B:B-A:B  4.8  0.4422244  9.15777557 0.0283967
```

```
>
```

```
> #evaluar homocedasticidad
```

```
> leveneTest( C6~medio*aditivo, data=crec)
```

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
  Df F value Pr(>F)  
group 3  0.6275 0.6077  
16
```

```
> aov_residuales<-residuals(object=model1)
```

```
> shapiro.test(x=aov_residuales)
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: aov_residuales
```

W = 0.96065, p-value = 0.5569

Biomasa y parámetros de crecimiento Pepino

Tabla de valores

PFV

```
> pepino.modelo <- aov( PFV ~ endofito*micorriza, data= parametros)
> summary(pepino.modelo)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
endofito	1	0.1	0.10	0.004	0.947
micorriza	2	38.6	19.29	0.882	0.421
endofito:micorriza	2	86.0	43.02	1.966	0.151
Residuals	48	1050.1	21.88		

TUKEY

```
> tukey_hsd(pepino.modelo)
```

```
# A tibble: 19 x 9
```

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr>	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>
1 endofito	A	B	0	-0.0844	-2.64	2.48	0.947	ns
2 micorriza	A	B	0	0.266	-3.51	4.04	0.984	ns
3 micorriza	A	C	0	1.91	-1.86	5.68	0.444	ns
4 micorriza	B	C	0	1.65	-2.13	5.42	0.546	ns
5 endofito:micorriza	A:A	B:A	0	-2.4	-8.94	4.14	0.884	ns
6 endofito:micorriza	A:A	A:B	0	-2.65	-9.19	3.90	0.834	ns
7 endofito:micorriza	A:A	B:B	0	0.779	-5.76	7.32	0.999	ns
8 endofito:micorriza	A:A	A:C	0	1.35	-5.19	7.89	0.99	ns
9 endofito:micorriza	A:A	B:C	0	0.0711	-6.47	6.61	1	ns
10 endofito:micorriza	B:A	A:B	0	-0.248	-6.79	6.30	1	ns
11 endofito:micorriza	B:A	B:B	0	3.18	-3.36	9.72	0.702	ns
12 endofito:micorriza	B:A	A:C	0	3.75	-2.79	10.3	0.538	ns
13 endofito:micorriza	B:A	B:C	0	2.47	-4.07	9.01	0.87	ns
14 endofito:micorriza	A:B	B:B	0	3.43	-3.12	9.97	0.632	ns
15 endofito:micorriza	A:B	A:C	0	4.00	-2.54	10.5	0.467	ns
16 endofito:micorriza	A:B	B:C	0	2.72	-3.82	9.26	0.818	ns
17 endofito:micorriza	B:B	A:C	0	0.572	-5.97	7.12	1	ns
18 endofito:micorriza	B:B	B:C	0	-0.708	-7.25	5.84	1	ns
19 endofito:micorriza	A:C	B:C	0	-1.28	-7.82	5.26	0.992	ns

```
> levene_test(parametros, PFV ~ endofito*micorriza)
```

```
# A tibble: 1 x 4
```

df1	df2	statistic	p	
<int>	<int>	<dbl>	<dbl>	
1	5	48	0.288	0.917

```
> aov_residuals<-residuals(object=pepino.modelo)
```

```
> shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
```

W = 0.95928, p-value = **0.06396**

PSV

```
> pepino.modelo <- aov( PSV ~ endofito*micorriza, data= parametros)
```

```
> summary(pepino.modelo)
```

```

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
endofito    1  0.96  0.9627  0.805 0.3741
micorriza    2  6.25  3.1258  2.614 0.0837 .
endofito:micorriza 2  1.87  0.9355  0.782 0.4631
Residuals   48 57.40  1.1959

```

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

>
> #Tukey para ver cual media es diferente de cual
> tukey_hsd(pepino.modelo)
# A tibble: 19 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr>         <chr> <chr>   <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl> <dbl> <chr>
1 endofito      A     B       0  0.267 -0.331  0.865 0.374 ns
2 micorriza     A     B       0 -0.589 -1.47   0.292 0.248 ns
3 micorriza     A     C       0  0.216 -0.666  1.10  0.825 ns
4 micorriza     B     C       0  0.805 -0.0766 1.69  0.0799 ns
5 endofito:micorriza A:A   B:A     0 -0.238 -1.77   1.29  0.997 ns
6 endofito:micorriza A:A   A:B     0 -0.903 -2.43   0.627 0.505 ns
7 endofito:micorriza A:A   B:B     0 -0.513 -2.04   1.02  0.917 ns
8 endofito:micorriza A:A   A:C     0 -0.228 -1.76   1.30  0.998 ns
9 endofito:micorriza A:A   B:C     0  0.421 -1.11   1.95  0.963 ns
10 endofito:micorriza B:A   A:B     0 -0.666 -2.20   0.864 0.788 ns
11 endofito:micorriza B:A   B:B     0 -0.276 -1.81   1.25  0.994 ns
12 endofito:micorriza B:A   A:C     0  0.0100 -1.52   1.54 1 ns
13 endofito:micorriza B:A   B:C     0  0.659 -0.871  2.19  0.795 ns
14 endofito:micorriza A:B   B:B     0  0.39 -1.14   1.92  0.973 ns
15 endofito:micorriza A:B   A:C     0  0.676 -0.854  2.21  0.778 ns
16 endofito:micorriza A:B   B:C     0  1.32 -0.206  2.85  0.125 ns
17 endofito:micorriza B:B   A:C     0  0.286 -1.24   1.82  0.993 ns
18 endofito:micorriza B:B   B:C     0  0.934 -0.596  2.46  0.468 ns
19 endofito:micorriza A:C   B:C     0  0.649 -0.881  2.18  0.805 ns

```

```

>
> levene_test(parametros, PSV ~ endofito*micorriza)
# A tibble: 1 x 4

```

```

  df1 df2 statistic p
<int> <int> <dbl> <dbl>
1 5 48 1.16 0.344

```

```

>
> aov_residuals<-residuals(object=pepino.modelo)
> shapiro.test(x=aov_residuals)

```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: aov_residuals
W = 0.98559, p-value = 0.7588

```

```

> qqPlot(pepino.modelo)
[1] 18 29

```

LV

```

> pepino.modelo <- aov( LV ~ endofito*micorriza, data= parametros)
> summary(pepino.modelo)

```

```

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
endofito    1 1478 1477.9  2.345 0.132

```

```
micorriza      2  322 160.9 0.255 0.776
endofito:micorriza 2  448 224.2 0.356 0.702
Residuals     48 30252 630.3
```

```
> tukey_hsd(pepino.modelo)
# A tibble: 19 x 9
```

term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
* <chr>	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>
1 endofito	A	B	0	10.5	-3.28	24.2	0.132	ns
2 micorriza	A	B	0	4.22	-16.0	24.5	0.869	ns
3 micorriza	A	C	0	-1.56	-21.8	18.7	0.981	ns
4 micorriza	B	C	0	-5.78	-26.0	14.5	0.77	ns
5 endofito:micorriza	A:A	B:A	0	3.28	-31.8	38.4	1	ns
6 endofito:micorriza	A:A	A:B	0	-2.83	-38.0	32.3	1	ns
7 endofito:micorriza	A:A	B:B	0	14.6	-20.6	49.7	0.82	ns
8 endofito:micorriza	A:A	A:C	0	-5.28	-40.4	29.8	0.998	ns
9 endofito:micorriza	A:A	B:C	0	5.44	-29.7	40.6	0.997	ns
10 endofito:micorriza	B:A	A:B	0	-6.11	-41.2	29.0	0.995	ns
11 endofito:micorriza	B:A	B:B	0	11.3	-23.8	46.4	0.93	ns
12 endofito:micorriza	B:A	A:C	0	-8.56	-43.7	26.6	0.978	ns
13 endofito:micorriza	B:A	B:C	0	2.17	-33.0	37.3	1	ns
14 endofito:micorriza	A:B	B:B	0	17.4	-17.7	52.5	0.685	ns
15 endofito:micorriza	A:B	A:C	0	-2.44	-37.6	32.7	1	ns
16 endofito:micorriza	A:B	B:C	0	8.28	-26.8	43.4	0.981	ns
17 endofito:micorriza	B:B	A:C	0	-19.8	-55.0	15.3	0.554	ns
18 endofito:micorriza	B:B	B:C	0	-9.11	-44.2	26.0	0.971	ns
19 endofito:micorriza	A:C	B:C	0	10.7	-24.4	45.8	0.943	ns

```
>
> levene_test(parametros, LV ~ endofito*micorriza)
# A tibble: 1 x 4
```

df1	df2	statistic	p	
<int>	<int>	<dbl>	<dbl>	
1	5	48	1.06	0.395

```
> aov_residuals<-residuals(object=pepino.modelo)
> shapiro.test(x=aov_residuals)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuals
W = 0.9568, p-value = 0.0496
```

PFR

```
> pepino.modelo <- aov( PFR ~ endofito*micorriza, data= parametros)
> summary(pepino.modelo)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
endofito	1	126.7	126.67	17.517	0.000124 ***
micorriza	2	75.8	37.90	5.242	0.008812 **
endofito:micorriza	2	12.2	6.11	0.845	0.436007
Residuals	47	339.9	7.23		

```
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
>
> #Tukey para ver cual media es diferente de cual
> tukey_hsd(pepino.modelo)
```

```
# A tibble: 19 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr>         <chr> <chr>   <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl> <chr>
1 endofito      A     B       0 -3.09 -4.58 -1.61 0.000124 ***
2 micorriza     A     B       0 -1.44 -3.61  0.730 0.253 ns
3 micorriza     A     C       0  1.50 -0.696  3.71 0.233 ns
4 micorriza     B     C       0  2.94  0.743  5.14 0.00617 **
5 endofito:micorriza A:A   B:A     0 -3.12 -6.88  0.650 0.158 ns
6 endofito:micorriza A:A   A:B     0 -1.99 -5.75  1.78 0.624 ns
7 endofito:micorriza A:A   B:B     0 -4.01 -7.77 -0.241 0.031 *
8 endofito:micorriza A:A   A:C     0  2.18 -1.70  6.06 0.56 ns
9 endofito:micorriza A:A   B:C     0 -2.21 -5.97  1.56 0.512 ns
10 endofito:micorriza B:A   A:B     0  1.13 -2.64  4.89 0.947 ns
11 endofito:micorriza B:A   B:B     0 -0.891 -4.66  2.87 0.981 ns
12 endofito:micorriza B:A   A:C     0  5.29  1.41  9.18 0.00247 **
13 endofito:micorriza B:A   B:C     0  0.908 -2.86  4.67 0.979 ns
14 endofito:micorriza A:B   B:B     0 -2.02 -5.79  1.75 0.607 ns
15 endofito:micorriza A:B   A:C     0  4.16  0.283  8.05 0.0289 *
16 endofito:micorriza A:B   B:C     0 -0.221 -3.99  3.54 1 ns
17 endofito:micorriza B:B   A:C     0  6.18  2.30 10.1 0.000284 ***
18 endofito:micorriza B:B   B:C     0  1.80 -1.97  5.56 0.715 ns
19 endofito:micorriza A:C   B:C     0 -4.39 -8.27 -0.504 0.0184 *
```

```
> levene_test(parametros, PFR ~ endofito*micorriza)
```

```
# A tibble: 1 x 4
```

```
  df1 df2 statistic  p
<int> <int>   <dbl> <dbl>
1    5  47    2.82 0.0264
```

```
>
```

```
> aov_residuales<-residuals(object=pepino.modelo)
```

```
> shapiro.test(x=aov_residuales)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: aov_residuales
```

```
W = 0.9784, p-value = 0.4473
```

PSR

```
> boxplot(PSR ~ endofito*micorriza, data=parametros)
```

```
> # anova
```

```
> pepino.modelo <- aov( PSR ~ endofito*micorriza, data= parametros)
```

```
> summary(pepino.modelo)
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
endofito      1 0.1049 0.10489   5.183 0.0274 *
micorriza     2 0.0831 0.04155   2.053 0.1397
endofito:micorriza 2 0.0387 0.01936   0.957 0.3915
Residuals    47 0.9511 0.02024
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
>
```

```
> #Tukey para ver cual media es diferente de cual
```

```
> tukey_hsd(pepino.modelo)
```

```
# A tibble: 19 x 9
```

```
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr>         <chr> <chr>   <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl> <chr>
1 endofito      A     B       0 -0.0890 -0.168 -0.0104 0.0274 *
```

```

2 micorriza      A   B      0 -0.045 -0.160  0.0698 0.612 ns
3 micorriza      A   C      0  0.0524 -0.0640  0.169 0.525 ns
4 micorriza      B   C      0  0.0974 -0.0190  0.214 0.117 ns
5 endofito:micorriza A:A   B:A      0 -0.0156 -0.215  0.184 1 ns
6 endofito:micorriza A:A   A:B      0  0.0122 -0.187  0.211 1 ns
7 endofito:micorriza A:A   B:B      0 -0.118 -0.317  0.0814 0.503 ns
8 endofito:micorriza A:A   A:C      0  0.111 -0.0948  0.316 0.603 ns
9 endofito:micorriza A:A   B:C      0 -0.0189 -0.218  0.180 1 ns
10 endofito:micorriza B:A   A:B      0  0.0278 -0.171  0.227 0.998 ns
11 endofito:micorriza B:A   B:B      0 -0.102 -0.301  0.0970 0.651 ns
12 endofito:micorriza B:A   A:C      0  0.126 -0.0792  0.331 0.461 ns
13 endofito:micorriza B:A   B:C      0 -0.00333 -0.203  0.196 1 ns
14 endofito:micorriza A:B   B:B      0 -0.130 -0.329  0.0692 0.392 ns
15 endofito:micorriza A:B   A:C      0  0.0983 -0.107  0.304 0.713 ns
16 endofito:micorriza A:B   B:C      0 -0.0311 -0.230  0.168 0.997 ns
17 endofito:micorriza B:B   A:C      0  0.228  0.0230  0.434 0.0213 *
18 endofito:micorriza B:B   B:C      0  0.0989 -0.100  0.298 0.682 ns
19 endofito:micorriza A:C   B:C      0 -0.129 -0.335  0.0759 0.431 ns
> levene_test(parametros, PSR ~ endofito*micorriza)
# A tibble: 1 x 4
  df1 df2 statistic p
<int> <int> <dbl> <dbl>
1 5 47 1.96 0.102
>
> aov_residuals<-residuals(object=pepino.modelo)
> shapiro.test(x=aov_residuals)

```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: aov_residuals
W = 0.98638, p-value = 0.8038

```

```

> qqPlot(pepino.modelo)
[1] 19 21

```

PF

```

anova
> pepino.modelo <- aov( PF ~ endofito*micorriza, data= parametros)
> summary(pepino.modelo)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
endofito	1	1.802	1.8023	2.480	0.127
micorriza	2	1.004	0.5018	0.690	0.510
endofito:micorriza	2	0.003	0.0015	0.002	0.998
Residuals	27	19.624	0.7268		

```

>
> tukey_hsd(pepino.modelo)
# A tibble: 19 x 9
  term          group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high p.adj p.adj.signif
* <chr>        <chr> <chr> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 endofito     A     B      0  0.473 -0.143  1.09  0.127 ns
2 micorriza    A     B      0  0.204 -0.648  1.06  0.825 ns
3 micorriza    A     C      0 -0.233 -1.22  0.749 0.827 ns
4 micorriza    B     C      0 -0.437 -1.37  0.500 0.489 ns
5 endofito:micorriza A:A   B:A      0  0.501 -1.27  2.27 0.951 ns
6 endofito:micorriza A:A   A:B      0  0.181 -1.12  1.49 0.998 ns

```

```

7 endofito:micorriza A:A B:B      0  0.724 -0.687  2.13 0.622 ns
8 endofito:micorriza A:A A:C      0 -0.246 -2.01  1.52 0.998 ns
9 endofito:micorriza A:A B:C      0  0.259 -1.23  1.75 0.994 ns
10 endofito:micorriza B:A A:B      0 -0.320 -2.09  1.45 0.993 ns
11 endofito:micorriza B:A B:B      0  0.223 -1.62  2.07 0.999 ns
12 endofito:micorriza B:A A:C      0 -0.747 -2.88  1.39 0.888 ns
13 endofito:micorriza B:A B:C      0 -0.241 -2.15  1.67 0.999 ns
14 endofito:micorriza A:B B:B      0  0.543 -0.868  1.95 0.843 ns
15 endofito:micorriza A:B A:C      0 -0.427 -2.20  1.34 0.975 ns
16 endofito:micorriza A:B B:C      0  0.0783 -1.41  1.57 1 ns
17 endofito:micorriza B:B A:C      0 -0.97 -2.82  0.877 0.6 ns
18 endofito:micorriza B:B B:C      0 -0.465 -2.05  1.12 0.943 ns
19 endofito:micorriza A:C B:C      0  0.505 -1.40  2.41 0.963 ns

```

```

>
> levene_test(parametros, PF ~ endofito*micorriza)
# A tibble: 1 x 4
  df1 df2 statistic p
  <int> <int> <dbl> <dbl>
1 5 27 1.50 0.223
>
> aov_residuals<-residuals(object=pepino.modelo)
> shapiro.test(x=aov_residuals)

```

Shapiro-Wilk normality test

```

data: aov_residuals
W = 0.97582, p-value = 0.6551

```

NF

```

> m0 <- glm.nb(NF~ 1, data = NF)
> m1 <- glm.nb(NF~ trat.end, data = NF)
> m2 <- glm.nb(NF ~ trat.mic, data = NF)
> m3 <- glm.nb(NF ~ trat.end + trat.mic, data = NF)
> m4 <- glm.nb(NF ~ trat.end * trat.mic, data = NF)
> summary(m1)

```

Call:

```

glm.nb(formula = NF ~ trat.end, data = NF, init.theta = 6.19472215,
link = log)

```

Deviance Residuals:

```

  Min    1Q  Median    3Q   Max
-2.0559 -0.9530 -0.2889  0.4722  2.1535

```

Coefficients:

```

      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  1.6458    0.1145  14.368 < 2e-16 ***
trat.endB   -0.7221    0.1839  -3.928 8.58e-05 ***
---

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(6.1947) family taken to be 1)

```

Null deviance: 70.224 on 53 degrees of freedom
Residual deviance: 54.362 on 52 degrees of freedom

```

AIC: 243.65

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 6.19
Std. Err.: 3.20

2 x log-likelihood: -237.647
>
> summary(m2)

Call:
glm.nb(formula = NF ~ trat.mic, data = NF, init.theta = 3.967633276,
link = log)

Deviance Residuals:
Min 1Q Median 3Q Max
-2.0835 -1.0392 -0.3961 0.5732 1.9504

Coefficients:
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) 1.5285 0.1614 9.470 <2e-16 ***
trat.micB -0.4676 0.2435 -1.920 0.0548 .
trat.micC -0.1284 0.2318 -0.554 0.5798

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(3.9676) family taken to be 1)

Null deviance: 58.695 on 53 degrees of freedom
Residual deviance: 54.833 on 51 degrees of freedom
AIC: 255.8

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 3.97
Std. Err.: 1.59

2 x log-likelihood: -247.803
>
> summary(m3)

Call:
glm.nb(formula = NF ~ trat.end + trat.mic, data = NF, init.theta = 8.137050506,
link = log)

Deviance Residuals:
Min 1Q Median 3Q Max
-2.0177 -0.9826 -0.1020 0.5552 2.0798

Coefficients:
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) 1.7824 0.1566 11.384 <2e-16 ***

```
trat.endB -0.7156 0.1764 -4.055 5.01e-05 ***
trat.micB -0.4232 0.2157 -1.962 0.0498 *
trat.micC -0.0478 0.2012 -0.238 0.8122
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(8.1371) family taken to be 1)

Null deviance: 76.790 on 53 degrees of freedom
Residual deviance: 54.841 on 50 degrees of freedom
AIC: 243.36

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 8.14
Std. Err.: 5.05

2 x log-likelihood: -233.365

>

> summary(m4)

Call:

```
glm.nb(formula = NF ~ trat.end * trat.mic, data = NF, init.theta = 34.76327323,
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.9721	-0.5706	0.0000	0.4219	1.7101

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2.0369	0.1330	15.315	< 2e-16 ***
trat.endB	-1.5950	0.3038	-5.250	1.52e-07 ***
trat.micB	-0.7077	0.2243	-3.156	0.00160 **
trat.micC	-0.6232	0.2189	-2.847	0.00441 **
trat.endB:trat.micB	0.9591	0.4286	2.238	0.02523 *
trat.endB:trat.micC	1.5677	0.3918	4.001	6.30e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(34.7633) family taken to be 1)

Null deviance: 100.70 on 53 degrees of freedom
Residual deviance: 53.85 on 48 degrees of freedom
AIC: 232.1

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 34.8
Std. Err.: 65.0

2 x log-likelihood: -218.104

> ##Parametro de sobredispersión m1

```

> e1 <- resid(m1, type = "pearson")
> dispersion <-sum(e1^2) / (m1$df.res)
> dispersion
[1] 1.102282
>
> ##Parametro de sobredispersión m2
> e1 <- resid(m2, type = "pearson")
> dispersion <-sum(e1^2) / (m2$df.res)
> dispersion
[1] 0.9830128
>
> ##Parametro de sobredispersión m3
> e1 <- resid(m3, type = "pearson")
> dispersion <-sum(e1^2) / (m3$df.res)
> dispersion
[1] 1.112569
>
> ##Parametro de sobredispersión m4
> e1 <- resid(m4, type = "pearson")
> dispersion <-sum(e1^2) / (m4$df.res)
> dispersion
[1] 1.062473
> ##Ver cual es el mejor modelo para presentar en los resultados
> anova(m0, m1, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

Response: NF

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	1 3.453496	53	-251.5331			
2	trat.end 6.194722	52	-237.6470	1 vs 2	1 13.88604	0.0001942354

```

> anova(m0, m2, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

Response: NF

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	1 3.453496	53	-251.5331			
2	trat.mic 3.967633	51	-247.8035	1 vs 2	2 3.729627	0.1549251

```

> anova(m1, m3, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

Response: NF

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.end 6.194722	52	-237.6470			
2	trat.end + trat.mic 8.137051	50	-233.3646	1 vs 2	2 4.282454	0.1175106

```

> anova(m1, m4, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

```

Response: NF

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.end 6.194722	52	-237.6470			
2	trat.end * trat.mic 34.763273	48	-218.1044	1 vs 2	4 19.54263	

Micorrización en Pepino

Micorrizas totales

```
> modelo1 <- glm(Total ~ trat.end + trat.mic, family = poisson, data = mico_pepino)
> summary(modelo1)
```

Call:

```
glm(formula = Total ~ trat.end + trat.mic, family = poisson,
     data = mico_pepino)
```

Deviance Residuals:

```
   Min      1Q  Median      3Q     Max
-11.2016 -1.5147  0.6229  2.1184  6.1462
```

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  5.02997   0.02505  200.84 < 2e-16 ***
trat.endB    -0.89100   0.03639  -24.48 < 2e-16 ***
trat.micB    -0.12088   0.03311   -3.65 0.000262 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

```
Null deviance: 1097.41 on 35 degrees of freedom
Residual deviance: 423.71 on 33 degrees of freedom
AIC: 652.08
```

Number of Fisher Scoring iterations: 4

```
> ##Parametro de sobredispersión
> e1 <- resid(modelo1, type = "pearson")
> dispersion <- sum(e1^2) / (modelo1$df.res)
> dispersion
[1] 10.48365
> m0 <- glm.nb(Total ~ 1, data = mico_pepino)
> m1 <- glm.nb(Total ~ trat.end, data = mico_pepino)
> m2 <- glm.nb(Total ~ trat.mic, data = mico_pepino)
> m3 <- glm.nb(Total ~ trat.end + trat.mic, data = mico_pepino)
> m4 <- glm.nb(Total ~ trat.end * trat.mic, data = mico_pepino)
```

Response: Total

```
   Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat. Pr(Chi)
1      1  2.491811    35   -393.5420
2 trat.end 5.336580    34   -370.1586 1 vs 2    1 23.38345 1.327153e-06
```

```
> anova(m0, m2, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Total

```
   Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat. Pr(Chi)
1      1  2.491811    35   -393.5420
2 trat.mic 2.515340    34   -393.2209 1 vs 2    1 0.3211091 0.5709419
```

```
> anova(m1, m3, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Total

```
   Model  theta Resid. df  2 x log-lik. Test  df LR stat. Pr(Chi)
1      1  5.336580    34   -370.1586
```

```
2 trat.end + trat.mic 5.442185 33 -369.6402 1 vs 2 1 0.5184154 0.4715184
> anova(m1, m4, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Total

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.end	5.336580	34	-370.1586				
2	trat.end * trat.mic	5.454469	32	-369.5797	1 vs 2	2	0.578882	0.748682

Call:

```
glm.nb(formula = Total ~ trat.end, data = mico_pepino, init.theta = 5.336579883,
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-5.1574	-0.3933	0.0479	0.4895	1.2085

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	4.9714	0.1039	47.847	< 2e-16 ***
trat.endB	-0.8910	0.1488	-5.987	2.13e-09 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(5.3366) family taken to be 1)

Null deviance: 79.998 on 35 degrees of freedom
Residual deviance: 45.083 on 34 degrees of freedom
AIC: 376.16

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 5.34
Std. Err.: 1.50

2 x log-likelihood: -370.159

Arbusculos

```
> m0 <- glm.nb(Arbusculos ~ 1, data = mico_pepino)
> m1 <- glm.nb(Arbusculos ~ trat.end, data = mico_pepino)
> m2 <- glm.nb(Arbusculos ~ trat.mic, data = mico_pepino)
> m3 <- glm.nb(Arbusculos ~ trat.end + trat.mic, data = mico_pepino)
> m4 <- glm.nb(Arbusculos ~ trat.end * trat.mic, data = mico_pepino)
> ##Ver cual es el mejor modelo para presentar en los resultados
> anova(m0, m1, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Arbusculos

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	1	2.278912	35	-363.7460				
2	trat.end	4.279678	34	-344.3041	1 vs 2	1	19.4419	1.037066e-05

```
> anova(m0, m2, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Arbusculos

```
Model theta Resid. df 2 x log-lik. Test df LR stat. Pr(Chi)
1 1 2.278912 35 -363.7460
2 trat.mic 2.702833 34 -358.0859 1 vs 2 1 5.660104 0.0173551
> anova(m1, m3, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Arbusculos

```
Model theta Resid. df 2 x log-lik. Test df LR stat. Pr(Chi)
1 trat.end 4.279678 34 -344.3041
2 trat.end + trat.mic 6.674831 33 -333.1856 1 vs 2 1 11.11847 0.0008547212
> anova(m3, m4, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models
```

Response: Arbusculos

```
Model theta Resid. df 2 x log-lik. Test df LR stat. Pr(Chi)
1 trat.end + trat.mic 6.674831 33 -333.1856
2 trat.end * trat.mic 6.678611 32 -333.1728 1 vs 2 1 0.01279821 0.9099281
```

> summary(m3)

Call:

```
glm.nb(formula = Arbusculos ~ trat.end + trat.mic, data = mico_pepino,
init.theta = 6.67483067, link = log)
```

Deviance Residuals:

```
Min 1Q Median 3Q Max
-4.7206 -0.5365 0.0799 0.5151 1.2622
```

Coefficients:

```
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) 4.2336 0.1176 35.995 < 2e-16 ***
trat.endB -0.8747 0.1372 -6.376 1.82e-10 ***
trat.micB 0.5109 0.1371 3.727 0.000194 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(6.6748) family taken to be 1)

```
Null deviance: 101.462 on 35 degrees of freedom
Residual deviance: 47.297 on 33 degrees of freedom
AIC: 341.19
```

Number of Fisher Scoring iterations: 1

```
Theta: 6.67
Std. Err.: 2.11
```

```
2 x log-likelihood: -333.186
Con endófitos, significativamente mayor que sin endófitos
Con micorrizas de Jatropha curcas significativamente mayor que con Gigaspora
```

Vesículas

```
> modelo1 <- glm(Vesiculas ~ trat.end + trat.mic, family = poisson, data = mico_pepino)
> summary(modelo1)
```

Call:

```
glm(formula = Vesiculas ~ trat.end + trat.mic, family = poisson,
     data = mico_pepino)
```

Deviance Residuals:

```
   Min     1Q  Median     3Q      Max
-5.0872 -2.1655 -0.5768  1.0053  5.4595
```

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  3.11371   0.06823  45.63 < 2e-16 ***
trat.endB    -1.68765   0.14172 -11.91 < 2e-16 ***
trat.micB    -0.55339   0.10683  -5.18 2.22e-07 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

```
Null deviance: 440.26 on 35 degrees of freedom
Residual deviance: 215.81 on 33 degrees of freedom
AIC: 340.64
```

Number of Fisher Scoring iterations: 5

```
> ##Parametro de sobredispersión
> e1 <- resid(modelo1, type = "pearson")
> dispersion <- sum(e1^2) / (modelo1$df.res)
> dispersion
[1] 6.236937
> m0 <- glm.nb(Vesiculas ~ 1, data = mico_pepino)
> m1 <- glm.nb(Vesiculas ~ trat.end, data = mico_pepino)
> m2 <- glm.nb(Vesiculas ~ trat.mic, data = mico_pepino)
> m3 <- glm.nb(Vesiculas ~ trat.end + trat.mic, data = mico_pepino)
> m4 <- glm.nb(Vesiculas ~ trat.end * trat.mic, data = mico_pepino)
> #Ver cual es el mejor modelo para presentar en los resultados
> anova(m0, m1, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Vesiculas

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.7073444	35	-242.6694			
2	trat.end 1.3634472	34	-223.2123	1 vs 2	1 19.45713	1.028833e-05

```
> anova(m0, m2, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Vesiculas

Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df LR stat.	Pr(Chi)
1	1 0.7073444	35	-242.6694			
2	trat.mic 0.7478385	34	-240.8231	1 vs 2	1 1.846286	0.1742159

```
> anova(m1, m3, test = "Chisq")
```

Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Vesiculas

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.end	1.363447	34	-223.2123				
2	trat.end + trat.mic	1.581287	33	-219.2979	1 vs 2	1	3.914374	0.04787485

> anova(m3, m4, test = "Chisq")
Likelihood ratio tests of Negative Binomial Models

Response: Vesiculas

	Model	theta	Resid. df	2 x log-lik.	Test	df	LR stat.	Pr(Chi)
1	trat.end + trat.mic	1.581287	33	-219.2979				
2	trat.end * trat.mic	1.589649	32	-219.1612	1 vs 2	1	0.1367438	0.7115398

> summary(m1)

Call:

```
glm.nb(formula = Vesiculas ~ trat.end, data = mico_pepino, init.theta = 1.363447157,  
link = log)
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.6825	-0.9031	-0.1822	0.5237	1.5522

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	2.8748	0.2095	13.724	< 2e-16 ***
trat.endB	-1.6877	0.3187	-5.295	1.19e-07 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for Negative Binomial(1.3634) family taken to be 1)

Null deviance: 68.754 on 35 degrees of freedom
Residual deviance: 42.060 on 34 degrees of freedom
AIC: 229.21

Number of Fisher Scoring iterations: 1

Theta: 1.363
Std. Err.: 0.417

2 x log-likelihood: -223.212

Anexo del capítulo 4

Analisis de biospeckle

Tabla de valores

N	nWGD	L1 E-	L3 E-	L6 E-	L7	L8 E-	L9	L13 E-	L14	L15 E+	L16	L17 E+	L18 E+	L19 E+	L20 E+
1	0.089	2	1	1	5	7	2	3	7	3	1	3	2	7	2
2	0.092	3	2	4	10	18	3	9	1	7	3	4	0	6	1
3	0.096	5	4	7	15	10	10	11	2	8	7	5	2	10	0
4	0.100	2	16	12	17	10	8	12	6	14	6	6	2	4	8
5	0.103	5	7	12	14	15	13	9	5	10	11	3	6	9	8
6	0.107	3	9	5	11	8	10	8	5	8	4	7	5	4	1
7	0.110	2	12	7	7	6	4	12	4	6	8	8	5	4	2
8	0.114	9	9	7	12	8	9	5	3	4	5	1	3	4	3
9	0.117	4	10	6	10	5	5	6	4	11	7	3	4	5	4
10	0.121	6	9	6	14	3	9	9	3	3	2	5	8	2	3
11	0.13	15	13	7	13	5	6	11	3	1	6	0	5	2	2
12	0.128	12	28	7	20	11	11	14	4	3	5	5	4	3	2
13	0.132	16	22	10	25	11	8	23	2	2	4	3	3	5	1
14	0.135	16	55	14	54	10	7	16	4	2	1	5	2	3	5
15	0.139	27	65	20	77	18	9	22	2	2	5	1	2	5	3
16	0.142	26	93	36	99	14	9	32	7	7	4	2	5	4	6
17	0.146	46	117	41	133	28	12	50	7	2	1	5	2	7	5
18	0.150	36	147	65	149	39	22	45	7	11	7	2	0	2	1
19	0.153	58	172	60	170	46	15	68	6	10	3	0	1	4	8
20	0.157	71	204	109	221	59	30	85	12	11	7	3	2	3	3
21	0.160	84	238	125	296	81	22	94	18	5	3	2	1	3	4
22	0.164	94	265	144	311	87	39	140	22	17	4	0	3	5	5
23	0.167	114	331	152	313	112	42	133	22	16	7	3	5	10	4
24	0.171	169	358	223	364	118	53	171	30	21	9	2	3	14	9
25	0.174	191	355	250	455	146	65	213	38	30	14	3	2	8	8
26	0.178	178	404	310	472	167	57	232	44	46	12	2	3	11	5
27	0.182	226	441	318	500	191	106	289	55	47	15	2	4	22	8
28	0.185	262	426	406	514	233	79	319	59	78	21	3	1	25	9
29	0.189	272	472	402	510	226	96	313	74	88	37	3	0	40	13
30	0.192	340	455	494	580	263	115	377	76	96	35	3	2	54	26
31	0.196	335	533	508	576	261	120	383	95	106	44	1	5	63	21
32	0.199	350	533	549	601	302	140	450	105	111	58	2	6	77	41
33	0.203	423	547	553	599	331	171	442	99	132	73	7	2	91	34
34	0.207	429	537	574	593	341	182	505	128	158	95	8	6	114	34
35	0.210	455	514	591	581	407	178	470	133	177	138	10	6	159	42
36	0.214	458	517	574	569	390	229	523	145	202	124	9	5	160	57
37	0.217	472	535	610	609	376	245	529	186	215	159	10	8	170	70
38	0.221	467	489	634	579	419	235	557	170	258	178	9	12	170	73
39	0.224	501	543	604	552	460	277	517	180	253	193	11	13	206	83
40	0.228	462	510	563	566	464	269	534	185	255	211	20	19	236	77
41	0.232	443	532	577	528	442	283	536	224	294	239	21	17	282	94
42	0.235	478	500	584	479	440	359	523	261	296	261	17	19	262	103
43	0.239	476	461	545	453	438	357	536	246	295	274	26	20	274	138
44	0.242	462	489	493	484	498	365	520	268	315	317	34	33	314	146
45	0.246	440	412	510	447	436	376	488	287	343	310	45	25	351	137
46	0.249	485	445	502	424	428	394	499	281	344	349	38	30	321	158
47	0.253	449	427	455	372	487	383	457	318	344	338	42	36	398	183
48	0.256	451	388	429	371	419	424	456	354	354	357	53	41	355	182
49	0.260	426	362	454	360	443	405	479	319	389	369	59	64	426	203
50	0.264	424	368	424	337	442	383	433	322	349	366	78	51	373	197
51	0.267	398	364	381	310	390	405	381	349	366	400	81	72	447	192
52	0.271	351	308	377	298	409	418	400	324	375	400	79	76	399	206
53	0.274	402	335	310	271	402	423	359	351	378	424	106	91	445	192
54	0.278	332	265	324	252	404	413	381	374	352	407	105	90	383	203
55	0.281	338	322	321	244	399	424	325	332	399	404	112	100	454	229
56	0.285	335	260	273	224	381	439	319	384	361	432	146	104	449	244
57	0.289	296	246	273	199	345	421	299	386	356	414	132	113	448	266
58	0.292	279	218	265	188	342	426	296	362	342	417	171	144	414	289
59	0.296	248	208	230	188	322	394	298	400	382	408	171	140	498	257
60	0.299	249	210	213	167	316	370	278	373	388	419	196	141	435	292
61	0.303	227	178	225	147	314	374	263	372	373	425	232	125	447	257
62	0.306	211	170	197	157	281	377	251	375	361	415	220	178	418	280

63	0.310	207	156	189	152	263	360	225	365	328	400	200	186	437	287
64	0.314	199	146	159	116	305	349	200	403	340	396	231	186	445	286
65	0.317	178	154	157	106	235	315	183	362	321	389	226	243	408	268
66	0.321	193	139	158	112	248	304	168	351	337	378	261	202	427	305
67	0.324	178	124	148	111	233	294	200	346	316	358	254	216	433	329
68	0.328	148	130	146	111	229	328	167	344	324	377	296	243	387	332
69	0.331	138	104	104	92	215	324	143	342	306	326	305	253	363	279
70	0.335	121	113	124	100	222	287	144	323	320	307	312	278	392	307
71	0.339	113	95	96	66	204	299	138	322	312	362	311	257	345	303
72	0.342	126	88	99	79	211	278	119	328	279	311	334	241	337	353
73	0.346	105	93	99	65	182	280	109	317	284	290	332	324	301	297
74	0.349	105	79	97	78	165	256	140	311	284	283	340	270	298	327
75	0.353	102	71	86	68	148	240	112	288	254	288	323	323	301	322
76	0.356	95	67	75	55	172	238	112	316	288	273	320	314	283	299
77	0.360	107	64	73	55	146	226	103	298	260	254	347	291	263	279
78	0.363	91	66	56	58	117	200	101	277	259	281	353	297	275	331
79	0.367	87	65	81	42	148	208	89	278	247	241	345	333	256	306
80	0.371	62	67	56	54	134	186	78	266	215	223	373	322	240	311
81	0.374	65	57	40	50	117	190	77	234	234	250	364	353	228	289
82	0.378	62	64	64	33	124	168	81	229	203	236	358	303	229	318
83	0.381	56	38	43	33	97	176	67	196	203	208	346	302	178	277
84	0.385	51	38	57	23	101	175	62	217	203	213	343	330	181	264
85	0.388	39	41	48	35	103	168	72	219	183	195	367	316	182	293
86	0.392	47	43	39	26	81	164	64	174	185	183	322	368	165	306
87	0.396	45	41	38	22	105	143	61	183	172	156	341	349	147	275
88	0.399	49	28	41	24	104	141	52	185	174	169	351	315	168	242
89	0.403	40	28	32	34	74	114	43	157	145	150	337	328	154	258
90	0.406	38	16	33	31	81	104	43	150	145	159	320	333	158	245
91	0.410	38	39	24	15	81	108	44	151	135	136	306	334	109	241
92	0.413	38	31	27	18	62	131	36	156	138	133	335	309	110	270
93	0.417	33	31	32	12	52	114	51	160	128	146	308	320	125	228
94	0.421	33	24	26	12	63	93	33	132	126	137	328	321	99	233
95	0.424	28	32	13	12	54	101	29	140	111	127	316	359	91	212
96	0.428	33	16	25	24	46	114	29	122	117	134	300	320	95	241
97	0.431	30	28	15	15	48	102	27	136	105	109	264	298	80	219
98	0.435	29	25	32	9	47	65	29	140	103	100	280	270	94	218
99	0.438	18	17	18	14	39	80	20	103	104	99	280	291	72	199
100	0.442	23	22	16	11	55	73	25	109	104	10	248	257	79	210
101	0.445	24	29	10	13	41	71	21	94	90	75	227	292	57	177
102	0.449	19	21	12	5	39	74	14	84	79	87	250	268	66	179
103	0.453	23	20	15	16	22	66	23	90	94	83	233	279	64	190
104	0.456	15	22	15	7	23	62	28	103	76	85	223	274	66	178
105	0.460	14	20	7	12	21	55	15	83	64	86	216	238	49	156
106	0.463	23	11	15	10	24	59	17	87	67	78	187	238	55	164
107	0.467	15	15	12	14	22	29	11	84	75	68	218	282	40	157
108	0.470	10	9	8	7	25	51	19	59	65	72	211	223	45	154
109	0.474	8	14	7	8	22	39	18	52	62	66	192	222	33	144
110	0.478	20	10	12	11	29	33	8	61	57	50	182	233	41	138
111	0.481	15	8	7	4	24	46	14	62	56	49	192	168	38	128
112	0.485	9	5	3	6	18	36	13	71	47	50	175	206	32	119
113	0.488	9	6	2	9	16	36	11	56	43	65	182	184	31	121
114	0.492	11	7	7	6	18	39	8	42	52	49	161	175	36	107
115	0.495	7	7	4	4	15	33	11	47	43	36	148	200	29	125
116	0.499	11	8	2	6	14	30	9	53	57	42	123	178	19	112
117	0.503	9	4	8	3	20	36	11	49	37	43	136	136	21	108
118	0.506	14	11	5	3	12	24	8	38	41	37	120	158	20	98
119	0.510	8	11	2	6	11	37	5	36	37	33	129	157	21	91
120	0.513	10	6	5	0	15	24	7	37	30	39	140	150	26	90
121	0.517	9	4	7	6	13	22	12	37	32	28	128	121	18	88
122	0.520	5	4	7	6	9	13	10	44	32	29	100	114	13	86
123	0.524	8	5	4	1	15	12	10	35	18	36	121	115	16	85
124	0.528	3	4	4	3	11	22	7	33	28	24	108	117	16	76
125	0.531	4	4	3	3	17	16	5	39	25	26	101	112	17	73

126	0.535	4	6	2	3	7	23	3	35	30	17	73	104	11	69
127	0.538	4	0	7	5	5	14	10	30	20	15	92	101	10	65
128	0.542	3	4	5	1	10	13	2	25	26	14	84	91	8	80
129	0.545	6	2	1	2	7	15	8	20	11	13	67	98	9	59
130	0.549	6	4	2	1	8	19	3	20	18	19	76	95	12	53
131	0.552	6	2	3	3	9	20	5	25	21	18	75	93	7	72
132	0.556	5	3	2	6	4	12	1	14	19	13	85	82	10	56
133	0.560	5	2	2	0	9	8	2	11	14	12	60	82	8	50
134	0.563	4	5	2	2	6	11	7	14	16	16	51	80	12	40
135	0.567	2	11	5	2	9	17	3	20	22	9	56	75	7	52
136	0.570	5	0	3	1	6	7	2	15	17	16	55	61	7	28
137	0.574	3	4	3	1	6	15	1	16	15	14	62	63	6	35
138	0.577	5	3	2	2	9	6	2	11	17	13	47	78	3	28
139	0.581	2	2	1	0	4	1	3	16	8	12	46	65	5	38
140	0.585	4	3	2	0	4	6	4	7	13	8	48	54	5	33
141	0.588	3	3	3	3	9	4	1	7	13	8	62	69	6	35
142	0.592	0	3	3	1	5	5	3	13	9	9	41	43	7	41
143	0.595	0	2	0	0	4	1	3	15	11	9	38	64	11	26
144	0.599	3	3	1	1	6	12	1	6	11	14	44	61	3	26
145	0.602	2	3	5	0	2	2	3	5	3	5	49	55	5	39
146	0.606	2	2	2	3	4	3	3	8	11	8	35	42	7	31
147	0.610	4	0	1	2	4	7	3	8	12	11	32	47	4	18
148	0.613	0	0	2	0	4	1	1	11	9	6	29	37	2	29
149	0.617	1	2	1	1	4	5	2	6	12	3	32	43	1	18
150	0.620	2	2	0	2	5	4	0	10	9	8	31	41	2	19
151	0.624	1	0	0	1	5	4	4	4	5	7	19	28	4	23
152	0.627	1	2	1	0	1	11	3	5	8	4	28	27	2	19
153	0.631	2	4	3	0	1	5	1	7	8	11	27	34	2	17
154	0.634	1	2	4	0	2	3	2	3	11	4	24	40	1	14
155	0.638	2	2	0	0	2	3	1	7	5	6	17	32	1	16
156	0.642	0	2	0	1	2	7	0	5	3	7	21	31	2	16
157	0.645	0	1	3	1	7	2	0	4	4	6	18	35	0	13
158	0.649	1	1	2	1	3	5	2	3	4	0	13	20	2	14
159	0.652	1	0	1	1	2	3	1	7	2	5	18	21	1	16
160	0.656	3	1	0	0	1	4	0	7	9	2	15	22	1	15
161	0.659	2	1	0	1	2	2	0	5	6	3	16	21	2	16
162	0.663	4	0	0	0	2	3	2	3	8	5	12	19	2	14
163	0.667	1	0	1	1	3	3	2	2	3	7	15	27	1	17
164	0.670	3	1	0	1	3	4	2	4	0	2	14	22	0	9
165	0.674	0	1	0	0	3	1	1	7	4	5	13	18	1	9
166	0.677	2	4	1	0	4	1	0	3	5	1	17	17	0	7
167	0.681	1	1	1	1	1	2	2	4	3	1	15	16	0	10
168	0.684	2	0	0	2	1	2	0	1	2	0	17	11	0	9
169	0.688	1	1	0	0	0	1	1	6	2	4	13	12	1	7
170	0.692	0	1	1	1	1	2	1	1	4	1	9	19	0	4
171	0.695	1	0	0	0	1	1	0	1	3	3	11	15	0	8
172	0.699	0	0	0	0	0	2	2	2	4	3	9	15	0	13
173	0.702	1	0	0	0	1	2	0	0	6	1	9	15	0	9
174	0.706	1	0	0	1	2	0	0	3	4	5	11	14	0	3
175	0.709	0	0	0	0	1	4	0	3	2	2	8	14	0	5
176	0.713	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	7	13	0	5
177	0.717	0	2	0	1	1	0	0	0	3	4	6	5	0	6
178	0.720	2	1	0	0	0	0	1	0	1	0	11	12	0	8
179	0.724	1	1	1	0	0	1	0	3	3	1	7	11	0	6
180	0.727	1	0	0	0	1	0	0	2	2	0	9	3	0	4
181	0.731	2	0	0	1	2	1	1	3	3	0	8	15	0	5
182	0.734	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	5	7	0	3
183	0.738	0	0	0	0	0	1	0	1	3	1	4	6	0	4
184	0.741	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	2	5	1	1
185	0.745	1	0	0	1	0	1	0	0	2	0	8	4	0	5
186	0.749	0	0	0	0	2	0	0	2	1	2	4	8	0	5
187	0.752	2	0	2	0	0	1	0	1	0	1	2	2	0	3
188	0.756	0	0	1	1	1	0	1	1	5	0	6	3	0	4

189	0.759	0	0	0	0	0	1	1	0	2	2	2	4	0	3
190	0.763	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	4	0	2
191	0.766	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	6	0	5
192	0.770	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	5	4	0	2
193	0.774	0	0	1	0	0	1	0	3	0	1	2	3	0	1
194	0.777	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	5	0	3
195	0.781	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	4	3	0	2
196	0.784	1	0	0	0	2	0	0	0	2	3	2	4	0	2
197	0.788	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
198	0.791	0	1	0	0	1	1	0	0	1	2	4	11	0	1
199	0.795	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1
200	0.799	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	3	0	5
201	0.802	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	1	0	2
202	0.806	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
203	0.809	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	2	0	2
204	0.813	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	0	0	0	1
205	0.816	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
206	0.820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	3
207	0.823	0	1	1	1	1	0	0	0	0	2	1	1	0	3
208	0.827	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	1	0	1
209	0.831	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3
210	0.834	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
211	0.838	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	4
212	0.841	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	1	0	2
213	0.845	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	1
214	0.848	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0
215	0.852	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	5
216	0.856	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1
217	0.859	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
218	0.863	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	2
219	0.866	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	2	0	1
220	0.870	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0
221	0.873	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0	1
222	0.877	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0
223	0.881	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	0.884	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
225	0.888	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
226	0.891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
227	0.895	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
228	0.898	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
229	0.902	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	0.906	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
231	0.909	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
232	0.913	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
233	0.916	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
234	0.920	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
235	0.923	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
236	0.927	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
237	0.930	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
238	0.934	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
239	0.938	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
240	0.941	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	0.945	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
242	0.948	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
243	0.952	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
244	0.955	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
245	0.959	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
246	0.963	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
247	0.966	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
248	0.970	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
249	0.973	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
250	0.977	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	0.980	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
252	0.984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
253	0.988	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
254	0.991	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
255	0.995	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0.998	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Referencias

Aamir, M., Rai, K. K., Zehra, A., Kumar, S., Yadav, M., Shukla, V., & Upadhyay, R. S. (2020). Fungal endophytes: Classification, diversity, ecological role, and their relevance in sustainable agriculture. In *Microbial Endophytes* (pp. 291-323). Woodhead Publishing.

Abarca, C., Barrera, M. D., Cabello, M., Valdés, F., & Velázquez, M. S. (2021). Invasion of a xeric forest by an exotic tree species in Argentina: Impacts on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and pre-existing mutualistic relationships. *Acta Botanica Brasilica*, *35*, 269-275.

Abdullah, N. S., Doni, F., Mispan, M. S., Saiman, M. Z., Yusuf, Y. M., Oke, M. A., & Suhaimi, N. S. M. (2021). Harnessing *Trichoderma* in agriculture for productivity and sustainability. *Agronomy*, *11*(12), 2559.

Abo Nouh, F. A. (2019). Endophytic fungi for sustainable agriculture. *Microbial Biosystems*, *4*(1), 31-44.

Achten, W. M., Mathijs, E., Verchot, L., Singh, V. P., Aerts, R. & Muys, B. (2007). *Jatropha curcas* biodiesel fueling sustainability? *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* *1*(4): 283-291

Adeleke, B. S., Fadiji, A. E., Ayilara, M. S., Igiehon, O. N., Nwachukwu, B. C., & Babalola, O. O. (2022). Strategies to Enhance the Use of Endophytes as Bioinoculants in Agriculture. *Horticulturae*, *8*(6), 498.

Agrios GN (1997) Plant Pathology. Academic Press, San Diego.

Albers, D., Schaefer, M. & Scheu, S. (2006). Incorporation of plant carbon into the soil animal food web of an arable system. *Ecology* 87(1): 235-245.

Ali, M. M., Bachik, N. A., Muhadi, N. A., Yusof, T. N. T., & Gomes, C. (2019). Non-destructive techniques of detecting plant diseases: A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 108, 1014-26

Allen, E. B. & Allen, F. A. (1984). Competition between plants of different successional stages: mycorrhizae as regulators. *Canadian Journal of Botany* 62(12): 2625-2629

Anaya, A. L., Saucedo-García, A., Contreras-Ramos, S. M., & Cruz-Ortega, R. (2013). Plant-mycorrhizae and endophytic fungi interactions: broad spectrum of allelopathy studies. In *Allelopathy* (pp. 55-80). Springer, Berlin, Heidelberg.

Anaya, A. L., Saucedo-García, A., Contreras-Ramos, S. M., Cruz-Ortega, R. (2013). Plant-mycorrhizae and endophytic fungi Interactions: broad spectrum of allelopathy studies. In: X. A. Chemma, M. Farooq, A. Wahid (eds). *Allelopathy*, pp: 55–80.

Ansari MZ, Nirala AK (2015) Biospeckle assessment of torn plant leaf tissue and automated computation of leaf vein density (LVD). *The European Physical Journal Applied Physics* 70 (2):21201

Antunes, P. M., Miller, J., Carvalho, L. M., Klironomos, J. N., Newman, J. A. (2008). Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Functional Ecology*. 22, 912-918.

Antunes, P. M., Miller, J., Carvalho, L.M., Klironomos, J. N. & Newman, J. A. (2008). Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Functional Ecology* 22(5): 912-918.

Aon, M. A., Cabello, M. N., Sarena, D. E., Colaneri, A. C., Franco, M. G., Burgos, J. L., & Cortassa, S. (2001). I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18(3), 239-254.

Arizaga RA, Cap NL, Rabal HJ, Trivi M (2002) Display of local activity using dynamical speckle patterns. *Optical Engineering* 4.

Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S., Coley P.D., Kursar T.A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyper diverse? *Ecology Letters*. 3:267-274.

Arnold AE, Engelbrecht BM (2007) Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology* 23 (3):369-372.

Arnold, A. E. & Herre, E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*,95(3), 388-398.

Arnold, A. E. & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*. 88, 541–549.

Arnold, A. E., & Herre, E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*,95(3), 388-398.

Arnold, A. E., Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*. 88, 541–549.

Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649-15654.

Aschehoug, E. T., Metlen, K. L., Callaway, R. M. & Newcombe G. (2012). Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology*. 93(1): 3-8.

Aschehoug, E. T., Metlen, K. L., Callaway, R. M., & Newcombe, G. (2012). Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology*, 93(1), 3-8.

Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11 (1):3-42

Azzurro, E., Sbragaglia, V., Cerri, J., Bariche, M., Bolognini, L., Ben Souissi, J., ... & Moschella, P. (2019). Climate change, biological invasions, and the shifting distribution of Mediterranean fishes: A large-scale survey based on local ecological knowledge. *Global change biology*, 25(8), 2779-2792.

Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., ... & Holmes, K. A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224(6), 1449-1464.

Barančíková, G., Liptaj, T., & Prónayová, N. (2007). Phosphorus fractions in arable and mountain soils and their humic acids. *Soil and water research*, 2(4), 141.

Barrera, A., Hereme, R., Ruiz-Lara, S., Larrondo, L. F., Gundel, P. E., Pollmann, S., ... & Ramos, P. (2020). Fungal endophytes enhance the photoprotective mechanisms and photochemical efficiency in the Antarctic *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. exposed to UV-B radiation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 122.

Bates, G. E., & Neyman, J. (1952). Contributions to the theory of accident proneness. 1. an optimistic model of the correlation between light and severe accidents. California University Berkeley.

Beaver, A., Gonzalez Castaño, F. A. & Díaz, M. S. (2016). Life cycle analysis of *Jatropha curcas* as a sustainable biodiésel feedstock in Argentina.

Bever, J. D. (1994). Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology*, doi75(7), 1965-1977. doi: 10.2307/194160.

Bever, J. D. (2002). Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant and Soil* 244(1-2): 281-290.

Bever, J. D. (2003). Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist* 157(3): 465-473.

Bever, J. D., Platt, T. G., & Morton, E. R. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual review of microbiology*, 66, 265-283.

Bever, J. D., Westover K. M. & Antonovics J. (1997). Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology* 85: 561-573.

Bhai, R. S., Prameela, T. P., Vincy, K., Biju, C. N., Srinivasan, V., & Babu, K. N. (2019). Soil solarization and amelioration with calcium chloride or *Bacillus licheniformis*-an effective integrated strategy for the management of bacterial wilt of ginger incited by *Ralstonia pseudosolanacearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 903-917.

Boro, M., Sannyasi, S., Chettri, D., & Verma, A. K. (2022). Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. *Archives of Microbiology*, 204(11), 1-15.

Bower, C. A., Wilcox, L. V. (1965). Soluble salts. In: C. A. Black (ed). *Methods of soil analysis, agronomy*. American Society of Agronomy, Wisconsin, pp: 933–951.

Braga Jr R, Horgan G, Enes A, Miron D, Rabelo G, Barreto Filho J (2007) Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images. *Computers and Electronics in Agriculture* 58 (2):123-132.

Braga Jr, R. A., Rabelo, G. F., Granato, L. R., Santos, E. F., Machado, J. C., Arizaga, R., ... & Trivi, M. (2005). Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. *Biosystems engineering*, 91(4), 465-469.

Brainard, L. D., Koch, A. M., Gordon, A. M., Klironomos, J. N. (2013). Growth response of crops to soil microbial communities from conventional monocropping and tree-based intercropping systems. *Plant and Soil*. 363, 345–356.

Bray, R. H., Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*. 59, 39–46.

Bremner, J. M., Mulvaney, C. S. (1982). Nitrogen-total, In: A. L. Page, R. H. Miller, D.R. Keeney (eds). *Methods of Soil Analysis, Part 2 -Chemical and Microbiological Properties*, 2nd edn. *American Society of Agronomy*, Madison, pp: 595–624.

Brown, V. K. & Gange, A. C. (1989). Differential effects of above-and below-ground insect herbivory during early plant succession. *Oikos* 54: 67-76.

Bünemann, E. K., Smernik, R. J., Doolette, A. L., Marschner, P., Stonor, R., Wakelin, S. A., & McNeill, A. M. (2008). Forms of phosphorus in bacteria and fungi isolated from two Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1908-1915.

Buyer, J. S., Zuberer, D. A., Nichols, K. A., & Franzluebbers, A. J. (2011). Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil*, 339(1), 401-412.

Canabarro, N. I., Silva-Ortiz, P., Nogueira, L. A. H., Cantarella, H., Maciel-Filho, R., & Souza, G. M. (2023). Sustainability assessment of ethanol and biodiésel production in Argentina, Brazil, Colombia, and Guatemala. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 171, 113019.

Carels, N. (2013). Towards the Domestication of *Jatropha curcas*: The Integration of Sciences. *Jatropha curcas, Challenges for a New Energy Crop*. Bahadur B, Sujatha M & Carels N. (Eds.). *Springer, Verlag*, Nueva York. pp. 263-299

Carroll G.C. & Carroll F.E. (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific North West, USA. *Canadian Journal of Botany*; 56:3034-3043.

Cerón Rincón, L. E., & Ancízar Aristizábal Gutiérrez, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295.

Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48(5), 489-499.

Che Hamzah, N. H., Khairuddin, N., Siddique, B. M., & Hassan, M. A. (2020). Potential of *Jatropha curcas* L. as biodiésel feedstock in Malaysia: A concise review. *Processes*, 8(7), 786.

Chen, M., Chen, J., & Sun, F. (2008). Agricultural phosphorus flow and its environmental impacts in China. *Science of the Total Environment*, 405(1-3), 140-152.

Christian, N., Herre, E. A. & Clay, K. (2019). Foliar endophytic fungi alter patterns of nitrogen uptake and distribution in *Theobroma cacao*. *New phytologist*, 222(3), 1573-1583.

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

Clay, K., & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160(S4), S99-S127.

Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., & Wipf, D. (2015). Inorganic nitrogen uptake and transport in beneficial plant root-microbe interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 4-16.

Crawford, K. M., Bauer, J. T., Comita, L. S., Eppinga, M. B., Johnson, D. J., Mangan, S. A., ... & Bever, J. D. (2019). When and where plant-soil feedback may promote plant coexistence: a meta-analysis. *Ecology Letters*, 22(8), 1274-1284.

Currie, A. F., Wearn, J., Hodgson, S., Wendt, H., Broughton, S., & Jin, L. (2014). Foliar fungal endophytes in herbaceous plants: a marriage of convenience? *Advances in endophytic research* (pp. 61-81). Springer, New Delhi.

da Silva, N. M., de Araújo Neto, S. E., de Souza Souza, L. G., Uchôa, T. L., & Ferreira, R. L. F. (2019). Organic cultivation of yellow passion fruit using tall seedlings with long root systems. *Comunicata Scientiae*, 10(4), 477-483.

Dastogeer KM, Wylie SJ (2017) Plant–Fungi Association: Role of fungal endophytes in improving plant tolerance to water stress. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer, pp 143-159.

Datta, D., Behera, L., Chaudhary, V. T., Kumar, S., & Bisen, K. (2022). Endophytes: rendering systemic resistance to plants. In *Rhizosphere Microbes: Biotic Stress Management* (pp. 175-195). Singapore: Springer Nature Singapore.

Davis E.C., Shaw AJ. (2008). Biogeographic and phylogenetic patterns in diversity of liverwort-associated endophytes. *American Journal of Botany*. 95:914-924.

De Bary A. (1886). Ueber einige Sclerotinien und Sclero. *Botanische Zeitung* 44, 377–474.

de Castro, D. B., Gomes, J. E. S., Braga Jr, R. A., & Silveira, H. L. (2022). Mechanical vibration effects in the biospeckle laser technique for portable equipment application in agriculture. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(2), 2271-2289.

Deka, N., Patgiri, S. R., & Sharma, B. (2022). Exploring the diverse application of Endophytes and their potential in Stress management in Plants. *Zeichen Journal*

Del Fabbro, C., Prati, D. (2015). Invasive plant species do not create more negative soil conditions for other plants than natives. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 17, 87–95.

Devi, R., Kaur, T., Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A., & Yadav, A. N. (2020). Beneficial fungal communities from different habitats and their roles in plant growth promotion and soil health. *Microbial Biosystems*, 5(1), 21-47.

Dieng A., Duponnois R., Ndoye I., Baudoin E. (2015). Cultivation of *Jatropha curcas* L. leads to pronounced mycorrhizal community differences. *Soil Biology and Biochemistry*. 89, 1-11.

Dieng A., Duponnois R., Ndoye I., Baudoin E. (2015). Cultivation of *Jatropha curcas* L. leads to pronounced mycorrhizal community differences. *Soil Biology and Biochemistry*. 89, 1-11.

Dodet, M., & Collet, C. (2012). When should exotic forest plantation tree species be considered as an invasive threat and how should we treat them? *Biological invasions*, *14*(9), 1765-1778.

Doilom, M., Guo, J. W., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., ... & Xu, J. C. (2020). Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 585215.

Doran, J. W., & Parkin, T. B. (1994). Defining and assessing soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment*, *35*, 1-21.

Doran, J. W., & Parkin, T. B. (1997). Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. *Methods for assessing soil quality*, *49*, 25-37.

Du, X., Li, D., Xin, H., Zhou, W., Yang, R., Zhou, K., & Hu, C. (2019). The Conversion of *Jatropha curcas* Oil into Jet Fuel on NiMo/Al-MCM-41 Catalyst: Intrinsic Synergic Effects between Ni and Mo. *Energy Technology*, *7*(5), 1800809.

Ehrenfeld, J. G., Ravit B. & Elgersma K. (2005). Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of the Environmental and Resources* *30*: 75-115.

Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*. *9*, 59–67.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycetes. *Dematiaceous hyphomycetes*.

Ellis, M. B., Holliday, P., Waller, J. M., Brady, B. L. K., & Gibson, I. A. S. (1976). CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, (Set 50).

Elton, C. S., & Elton, C. S. (1958). *The reasons for conservation* (pp. 143-153). Springer US.

Eppinga, M. B., Rietkerk, M., Dekker, S. C., De Ruiter, P. C. (2006). Accumulation of local pathogens: a new hypothesis to explain exotic plant invasions. *Oikos*. 114, 168-176.

Español, Esteban. (2014). Endofitos de *Blepharocalyx salicifolius*: diversidad y factores que modulan el ensamble de las comunidades fúngicas. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.).

Estrada, C., Rojas, E. I., Wcislo, W. T., & Van Bael, S. A. (2013). Fungal endophyte effects on leaf chemistry alter the in vitro growth rates of leaf-cutting ants' fungal mutualist, *Leucocoprinus gongylophorus*. *fungus ecology*, 8, 37-45.

Falasca, S. & Bernabé, M. A. (2006). Impacto regional en la zona semiárida argentina implantando cultivos para biodiésel. IX Congreso Internacional de Ciencias de la Tierra. Santiago de Chile.

Falasca, S., Ulberich, A. & Sotelo, R. (2006). Distribución potencial del cultivo de piñón manso (*Jatropha curcas* L) en Argentina. CD rom X Reunión Argentina y IV Latinoamericana de Agrometeorología, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Farraro R, Fathi O, Choi B (2016) Handheld, point-of-care laser speckle imaging. *Journal of Biomedical Optics* 21 (9):094001.

Fatima, U., Bhorali, P., Borah, S., & Senthil-Kumar, M. (2019). Perspectives on the utilization of resistance mechanisms from host and nonhost plants for durable protection of *Brassica* crops against *Alternaria* blight. *PeerJ*, 7, e7486.

Fortin, M. C., Rochette, P., & Pattey, E. (1996). Soil carbon dioxide fluxes from conventional and no-tillage small-grain cropping systems. *Soil Science Society of America Journal*, 60(5), 1541-1547.

Fröhlich J & Hyde KD. (1999). Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity and Conservation* 8(7): 977-1004.

Gamboa M.A., Bayman P. (2001). Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea Guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*; 33:352360.

Ganley, R. J., Sniezko, R. A., & Newcombe, G. (2008). Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management*, 255(7), 2751-2760.

Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-210

García-Parisi P. A., & Omacini, M. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi can shift plant-soil feedback of grass-endophyte symbiosis from negative to positive. *Plant and Soil*, 419(1), 13-23.

Gibbons, S. M., Lekberg, Y., Mummey, D. L., Sangwan, N., Ramsey, P. W., & Gilbert, J. A. (2017). Invasive plants rapidly reshape soil properties in a grassland ecosystem. *MSystems*, 2(2), e00178-16.

Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., & Giovannetti, M. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. *Agronomy*, 10(1), 106

Golparyan, F., Azizi, A., & Soltani, J. (2018). Endophytes of *Lippia citriodora* (Syn. *Aloysia triphylla*) enhance its growth and antioxidant activity. *European Journal of Plant Pathology*, 152(3), 759-768.

Gourley, C.O. (1969). Microfungi of crowns and roots of apparently healthy dormant strawberry plants. *Canadian Journal of Botany*. 47:945–949

Grabka, R., d'Entremont, T. W., Adams, S. J., Walker, A. K., Tanney, J. B., Abbasi, P. A., & Ali, S. (2022). Fungal endophytes and their role in agricultural plant protection against pests and pathogens. *Plants*, 11(3), 384.

Guo, B. Z., Hendrix, J. W., An, Z. Q., & Ferriss, R. S. (1992). Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 84(6), 882-885.

Gutiérrez, L., & Santos, C. (2013). Potencial de la biomasa residual del fruto de *Jatropha curcas* L. para la producción de biogás: un enfoque experimental.

Halloin, J. M., De Zoeten, G. A., Gaard, G., & Walker, J. C. (1970). The effects of tentoxin on chlorophyll synthesis and plastid structure in cucumber and cabbage. *Plant Physiology*, 45(3), 310-314.

Hartley, S. E., & Gange, A. C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual review of entomology*, 54, 323-342.

Herre, E. A., Mejía, L. C., Kyllö, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88(3), 550-558.

Herrera, J. (2020). El piñón mexicano no tóxico (*Jatropha curcas* L.): importancia y fundamentos prácticos para su propagación, siembra y cuidados. DR© Odilón M. Sánchez Sánchez, Ofelia A. Valdés Rodríguez, Jorge Martínez Herrera, Diana E. Sánchez Herrera, autores. *Sánchez Sánchez, Ofelia A. Valdés Rodríguez, Jorge Martínez Herrera, Diana E. Sánchez Herrera, autores.*

Hoffman, M. T., Gunatilaka, M. K., Wijeratne, K., Gunatilaka, L., & Arnold, A. E. (2013). Endohyphal bacterium enhances production of indole-3-acetic acid by a foliar fungal endophyte. *PLoS One*, 8(9), e73132.

Hu, P., Wu, L., Hollister, E. B., Wang, A. S., Somenahally, A. C., Hons, F. M., & Gentry, T. J. (2019). Fungal community structural and microbial functional pattern changes after soil amendments by oilseed meals of *Jatropha curcas* and *Camelina sativa*: a microcosm study. *Frontiers in Microbiology*, 10, 537.

Hyde K, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33 (163): e173.

Igarashi, H., Takemura, K., Kono, T., Kadono, H., Yamada, J., & Rajagopalan, U. M. (2023, March). Laser biospeckle based novel method in the evaluation of far-red light effects on plant growth. In *Optical Interactions with Tissue and Cells XXXIV* (Vol. 12377, pp. 70-77). SPIE.

Ivancovich, A., Botta, G., Ploper, D.A., Laguna, I., Annone, J.G. (1998). IV Curso de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. EEA INTA Pergamino. 54 p.

Jackson, R. D. (1964). Water vapor diffusion in relatively dry soil: I. Theoretical considerations and sorption experiments. *Soil Science Society of America Journal*, 28(2), 172-176.

Jaiswal, M. & Pandey, A. K. (2013). Studies on endophytic fungi associated with *Jatropha curcas*. *Journal of Tropical Forestry*. 29, 68–71.

Jia, Q., Qu, J., Mu, H., Sun, H., & Wu, C. (2020). Foliar endophytic fungi: diversity in species and functions in forest ecosystems. *Symbiosis*, 80(2), 103-132.

Kamran, M., Imran, Q. M., Ahmed, M. B., Falak, N., Khatoon, A., & Yun, B. W. (2022). Endophyte-mediated stress tolerance in plants: a sustainable strategy to enhance resilience and assist crop improvement. *Cells*, 11(20), 3292.

Kashe, K., Kgathi, D. L., & Teketay, D. (2021). Invasiveness of biofuel crops: implications for energy research and policy in Botswana. *South African Geographical Journal*, 103(2), 259-281.

Ke, P. J., Miki, T., & Ding, T. S. (2015). The soil microbial community predicts the importance of plant traits in plant–soil feedback. *New phytologist*, 206(1), 329-341. doi: 10.1111/nph.13215.

Khan A. L., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A., Al-Farsi Z., Al-Mamari A., Waqas M., Asaf S., Elyassi A., Mabood F., Shin J. H., Lee I. J. (2016). Endophytic fungi from Frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid. *PLoS One* 11(6): e0158207

Khan, A. R., Ullah, I., Waqas, M., Shahzad, R., Hong, S. J., Park, G. S., ... & Shin, J. H. (2015). Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1461-1466.

Khan, M. A., Khan, S. A., Waheed, U., Raheel, M., Khan, Z., Alrefaei, A. F., & Alkhamis, H. H. (2021). Morphological and genetic characterization of *Fusarium oxysporum* and its management using weed extracts in cotton. *Journal of King Saud University-Science*, 33(2), 101299.

Klironomos, J. N. (2002). Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417(6884), 67-70.

Kopáček, J., Cosby, B. J., Evans, C. D., Hruška, J., Moldan, F., Oulehle, F., Šantrůčková, H., Tahovská, K., Wright, R. F. (2013). Nitrogen, organic carbon and sulphur cycling in terrestrial ecosystems: linking nitrogen saturation to carbon limitation of soil microbial processes. *Biogeochemistry*. 115, 33–51.

Krull, E. S., Bestland, E. A., & Gates, W. P. (2002). Soil organic matter decomposition and turnover in a tropical Ultisol: evidence from $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and geochemistry. *Radiocarbon*, 44(1), 93-112

Kulmatiski, A., Beard, K. H., Grenzer, J., Forero, L., & Heavilin, J. (2016). Using plant-soil feedbacks to predict plant biomass in diverse communities. *Ecology*, 97(8), 2064-2073. doi: 10.1890/15-2037.1

Kumar, S, Kaushik, N. (2013). Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PloS One*, 8(2), e56202.

Kusari, S., Zühlke, S., & Spiteller, M. (2011). Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. *Journal of natural products*, 74(4), 764-775.

Lacap, D. C., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*.

Lal, R. (2020). Managing soils for negative feedback to climate change and positive impact on food and nutritional security. *Soil Science and Plant Nutrition*, 66(1), 1-9.

Larekeng, S. H., Restu, M., & Amal, F. (2020). The ability of rhizosphere fungi isolate of mahogany [*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.] in dissolving phosphate. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 64-70.

Larimer, A. L., Bever, J. D., & Clay, K. (2010). The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis*, 51(2), 139-148.

Larimer, A. L., Clay, K., & Bever, J. D. (2014). Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology*, 95(4), 1045-1054.

Lawrence, D.P.; Gannibal, P.B.; Peever, T.L.; Pryor, B.M. (2013). The sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105, 530–546.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell publishing*, Iowa. 388 p.

Levins, R. (1974). Discussion paper: the qualitative analysis of partially specified systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 231(1), 123-138.

Li, Q. S., Xie, Y. C., Rahman, M. M., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., & Wu, Q. S. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic fungi activate leaf antioxidant defense system of lane late navel orange. *Journal of Fungi*, 8(3), 282.

Li, X., He, C., He, X., Su, F., Hou, L., Ren, Y., & Hou, Y. (2019). Dark septate endophytes improve the growth of host and non-host plants under drought stress through altered root development. *Plant and Soil*, 1-14.

Lindow SE, Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69 (4):1875-1883.

Liu, C., Lin, H., Dong, Y., & Li, B. (2022). Increase of P and Cd bioavailability in the rhizosphere by endophytes promoted phytoremediation efficiency of *Phytolacca acinosa*. *Journal of Hazardous Materials*, 431, 128546.

Liu, H., Wu, M., Liu, J., Qu, Y., Gao, Y., & Ren, A. (2020). Tripartite interactions between endophytic fungi, arbuscular mycorrhizal fungi, and *Leymus chinensis*. *Microbial ecology*, 79(1), 98-109

López-Bautista, V., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Mendoza-Ramos, C., Martínez-Bustamante, V. I., Coria-Contreras, J. J., ... & Santana-Peñaloza, B. (2020). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106.

Lösch R, Gansert D (2002) Organismic interactions and plant water relations. Progress in Botany. Springer, pp 258-285.

Malik, A. A., Puissant, J., Buckeridge, K. M., Goodall, T., Jehmlich, N., Chowdhury, S., ... & Griffiths, R. I. (2018). Land use driven change in soil pH affects microbial carbon cycling processes. *Nature communications*, 9(1), 1-10.

Mancini V, Murolo S, Romanazzi G (2016) Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. *Plant Pathology*, 65(5), 691-703.

Mansilla, V., Malbrán Barros, A., Cabrera, V. A., & Matesevach, M. (2021). Morfoanatomía del tallo con crecimiento secundario de especies de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) nativas de la Región Chaqueña Argentina y su relación con el ambiente. *Darwiniana, nueva serie*, 9(1), 75-94

Marín, C., Aguilera, P., Oehl, F., & Godoy, R. (2017). Factors affecting arbuscular mycorrhizal fungi of Chilean temperate rainforests. *Journal of soil science and plant nutrition*, *17*(4), 966-984.

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

Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A. E., Hebbar, P., ... & Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological control*, *46*(1), 4-14.

Meng, X., Fang, Y., Ding, M., Zhang, Y., Jia, K., Li, Z. ... & Liu, W. (2022). Developing fungal heterologous expression platforms to explore and improve the production of natural products from fungal biodiversity. *Biotechnology Advances*, *54*, 107866.

Miao, C. P., Mi, Q. L., Qiao, X. G., Zheng, Y. K., Chen, Y. W., Xu, L. H., Guan, H. L., Zhao, L. X. (2015). Rhizospheric fungi of *Panax notoginseng*: diversity and antagonism to host phytopathogens. *Journal of Ginseng Research* *40*, 127-134.

Mighell, K., Saltonstall, K., Turner, B. L., Espinosa-Tasón, J., & Van Bael, S. A. (2019). Abiotic and biotic drivers of endosymbiont community assembly in *Jatropha curcas*. *Ecosphere*, *10*(11), e02941.

Mohammed, A. T., Jaafar, M. N. M., Othman, N., Veza, I., Mohammed, B., Oshadumi, F. A., & Sanda, H. Y. (2021). Soil fertility enrichment potential of *Jatropha curcas* for

sustainable agricultural production: A case study of Birnin Kebbi, Nigeria. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 21061-21073

Mohammed, N. I., Kabbashi, N. A., Alam, M. Z., & Mirghani, M. E. (2014). *Jatropha curcas* oil characterization and its significance for feedstock selection in biodiesel production. *catalyst*, 6, 7.

Mohanty, S. R., Kollah, B., Banerjee, K., Dubey, G., Gour, V. K., Sharma, J. & Rao, A. S. (2013). Rhizospheric microbes associated with bioenergy crops with special reference to *Jatropha curcas*: a critical review on the prospects and future challenges for sustainable bio-energy production. *Scientific Research and Essays* 8(15): 615-622.

Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*, 33(4), 540-552.

Moshobane, M. C., Wium, C., & Mokgola, L. V. (2017). Acute poisoning in children from *Jatropha curcas* seeds. *South African Journal of Child Health*, 11(3), 149-150.

Muñoz, J. S. C., & Benavides, A. C. M. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + limpia*, 5(2), 77-96.

Murali T.S., Suryanarayanan T.S., Venkatesan G. (2007). Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation. *Mycological Progress*. 6:191-199.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, 265–270.

Negussie, A., Achten, W. M., Norgrove, L., Hermy, M., & Muys, B. (2013). Invasiveness risk of biofuel crops using *Jatropha curcas* L. as a model species. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(5), 485-498.

Neill, J.C. (1940). The endophyte of rye-grass (*Lolium perenne*). New Zealand. Journal of Science and Technology, Section A ;21:280–291.

Niella, F. O., Rocha, S. P., Eibl, B. I., Radins, M., Flor, D., Facio, S. ... & Britez, D. (2012). Desarrollo de métodos de propagación clonal para la domesticación de *Jatropha curcas* L. en Misiones (Argentina).

Nikas, A., Koasidis, K., Köberle, A. C., Kourtesi, G., & Doukas, H. (2022). A comparative study of biodiésel in Brazil and Argentina: An integrated systems of innovation perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 156, 112022.

Novas, M. V., Iannone, L. J., Godeas, A. M. & Scervino, J. M. (2011a). Evidence for leaf endophytes regulation on root symbionts: Effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 51 (1): 19-28.

Novas, M. V., Cabral, D., Godeas, A. M. (2005). Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis*. 40, 23–30.

Owen, N. L., & Hundley, N. (2004). Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. *Science progress*, 87(2), 79-99.

Oyuela Sandino, D., Hernández, E., Samayoa, S., Bueso, C., & Ponce, O. (2012). Guía técnico-ambiental para el cultivo de la *Jatropha curcas* (piñón).

- Padilla, F. M., Mattingly, W. B., Swedo, B. L., Clay, K., & Reynolds, H. L. (2012). Negative plant–soil feedbacks dominate seedling competitive interactions of North American successional grassland species. *Journal of Vegetation Science*, 23(4), 667-676.
- Pandey SS, Singh S, Babu CV, Shanker K, Srivastava N, Kalra A (2016) Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzyloisoquinoline alkaloids. *Planta* 243 (5):1097-1114.
- Pandiselvam, R., Mayookha, V. P., Kothakota, A., Ramesh, S. V., Thirumdas, R., & Juvvi, P. (2020). Biospeckle laser technique—A novel non-destructive approach for food quality and safety detection. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 1-13.
- Parawira, W. (2010). Biodiésel production from *Jatropha curcas*: A review. *A Review Scientific Research and Essays* 5 (14): 1796-1808.
- Park, D. (1963). The ecology of soil-borne fungal disease. *Annual Review of Phytopathology* 1: 241–258.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775.
- Paterlini, P., Jaime, G. S., Aden, C., Olivaro, C., Gómez, M. I., Cruz, K., ... & Romero, C. M. (2019). Seeds characterization of wild species *Jatropha curcas peiranoi* endemic of arid areas of Monte Desert Biome, Argentina. *Industrial Crops and Products*, 141, 111796.
- Patriarca, A. (2016). *Alternaria* in food products. *Current Opinion in Food Science*, 11, 1-9.

Paul, S., Bhagobaty, R. K., Nihalani, M. C., & Joshi, S. R. (2020). Characterization of oleaginous endophytic fungi of biodiesel plants as potential biofuel minifactories. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105750.

Pernilla Brinkman, E., Van der Putten, W. H., Bakker, E. J., & Verhoeven, K. J. (2010). Plant–soil feedback: experimental approaches, statistical analyses and ecological interpretations. *Journal of Ecology*, 98(5), 1063-1073.

Persoh D (2015) Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. *Fungal Diversity* 75 (1):1.

Petermann, J. S., Fergus, A. J., Turnbull, L. A., & Schmid, B. (2008). Janzen-Connell effects are widespread and strong enough to maintain diversity in grasslands. *Ecology*, 89 (9), 2399-2406. doi: 10.1890/07-2056.1

Petrini O., Müller E. (1979). Pilzliche Endophyte, am Beispiel von *Juniperus communis* L. *Sydowia*. 32:224-225.

Phillips, J. M., Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*,. 55, 158–161.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*, third ed. Springer, New York. 519p.

Punja, Z. K., Collyer, D., Scott, C., Lung, S., Holmes, J., & Sutton, D. (2019). Pathogens and molds affecting production and quality of *Cannabis sativa* L. *Frontiers in plant science*, 10, 1120.

- Rabal HJ, Braga Jr RA (2008) Dynamic laser speckle and applications. CRC press.
- Rabelo, G. F., Enes, A. M., Junior, R. A. B., & Dal Fabbro, I. M. (2011). Frequency response of biospeckle laser images of bean seeds contaminated by fungi. *Biosystems engineering*, 110(3), 297-301.
- Raghavendra, A. K., & Newcombe, G. (2013). The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora rust*. *New Phytologist*, 197(3), 909-918.
- Ramos Vásquez, E., & Zúñiga Dávila, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología aplicada*, 7(1-2), 123-130.
- Ranganayaki, N., Tilak, K. V., Manoharachary, C., & Mukerji, K. G. (2006). Methods and techniques for isolation, enumeration and characterization of rhizosphere microorganisms. In *Microbial Activity in the Rhizosphere* (pp. 17-38).
- Reddy, V. V., Ghante, P. H., & Kanase, K. M. (2019). Studies on morpho-cultural characters of *Alternaria alternata* infecting groundnut crop by using various culture media. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 85-87.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., & Henson, J. M. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298(5598), 1581-1581.
- Reinhart, C. F., Mardaljevic, J., & Rogers, Z. (2006). Dynamic daylight performance metrics for sustainable building design. *Leukos*, 3(1), 7-31.

Reinhart, K. O., & Callaway, R. M. (2006). Soil biota and invasive plants. *New phytologist*, 170(3), 445-457. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01715.x.

Ren, Y., Su, L., Hou, X., Shao, J., Liu, K., Shen, Q., ... & Xun, W. (2023). Rhizospheric compensation of nutrient cycling functions dominates crop productivity and nutrient use efficiency. *Applied Soil Ecology*, 182, 104722.

Reynolds, H. L., Packer, A., Bever, J. D., & Clay, K. (2003). Grassroots ecology: plant–microbe–soil interactions as drivers of plant community structure and dynamics. *Ecology*, 84 (9), 2281-2291. doi: 10.1890/02-0298

Riayatsyah, T. M. I., Sebayang, A. H., Silitonga, A. S., Padli, Y., Fattah, I. M. R., Kusumo, F., ... & Mahlia, T. M. I. (2022). Current progress of *Jatropha curcas* commoditisation as biodiésel feedstock: A comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 9, 1019.

Richardson, A. E., Lynch, J. P., Ryan, P. R., Delhaize, E., Smith, F. A., Smith, S. E., ... & Simpson, R. J. (2011). Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and soil*, 349(1), 121-156.

Ricks, K. D., & Koide, R. T. (2019). The role of inoculum dispersal and plant species identity in the assembly of leaf endophytic fungal communities. *PloS one*, 14(7), e0219832.

Rigal, C., Xu, J., & Vaast, P. (2019). Young shade trees rapidly improve soil fertility in coffee-agroforestry systems. CIRAD.

Rizali, A., & Wahdah, R. (2020). Utilization of Endophytes Fungi from *Jatropha curcas* Leaves (*Jatropha curcas* L.) Against *Fusarium oxysporum* Causing Tuber Rot Disease Onion (*Allium cepa* var. *Ascalonicum* (L.) Backer). *Journal of Pure and Applied Microbiology*.

Robledo, A., & Correal, E. (2013). Cultivos energéticos de segunda generación para la producción de biomasa lignocelulósica en tierras de cultivo marginales. IMIDA. Murcia: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Rodriguez, R. J., White Jr., J. F., Arnold, A. E., Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182, 314–330.

Rodriguez, R., & Durán, P. (2020). Natural holobiome engineering by using native extreme microbiome to counteract the climate change effects. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 568.

Rousk, J., Brookes, P. C., & Baath, E. (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1589-1596.

Rozemberg, R., Saslavsky, D. & Svarman, G. (2009). La industria de Biocombustibles en el Mercosur, Serie Red Mercosur N° 15, Ed. Red Mercosur, Montevideo.

Rudgers, J. A., & Orr, S. (2009). Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *Journal of Ecology*, 97(2), 247-255..

Saldarriaga Zambrano, G. E., & Zambrano Zambrano, E. V. (2014). Dosificación óptima de hidróxido de sodio como reactante de la alcalinidad del jabón en barra a base de piñón (*Jatropha curcas* L.) (Bachelor's thesis, Calceta: Espam).

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.

Shahrtash, M., & Brown, S. P. (2020). Drivers of foliar fungal endophytic communities of kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*) in the Southeast united states. *Diversity*, 12(5), 185.

Shvartsman LD, Fine I (2003) Optical transmission of blood: effect of erythrocyte aggregation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 50 (8):1026-1033.

Silva GM, Peixoto LS, Fujii AK, Parisi JJD, Aguiar RH, Fracarolli JA (2018) Evaluation of Maize seeds treated with Trichodermil® through Biospeckle. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 8 (2018) 175-187.

Simon, R. O., & Hülsbergen, K. J. (2021). Energy balance and energy use efficiency of annual bioenergy crops in field experiments in Southern Germany. *Agronomy*, 11(9), 1835.

Singh, A., Singh, D. K., Kharwar, R. N., White, J. F., & Gond, S. K. (2021). Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: insights, avenues, and challenges. *Microorganisms*, 9(1), 197.

Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Inda, C. S., Sharma, S., Sharma, P. K., & Jhalani, A. (2021). A comprehensive review of physicochemical properties, production process, performance and emissions characteristics of 2nd generation biodiesel feedstock: *Jatropha curcas*. *Fuel*, 285, 119110.

Singh, P., Chatterjee, A., Bhatia, V., & Prakash, S. (2020). Application of laser biospeckle analysis for assessment of seed priming treatments. *Computers and electronics in agriculture*, 169, 105212.

Singh, P., Chatterjee, A., Bhatia, V., & Prakash, S. (2020). Application of laser biospeckle analysis for assessment of seed priming treatments. *Computers and Electronics in Agriculture*, 169, 105212.

Singh, P., Chatterjee, A., Rajput, L. S., Rana, S., Kumar, S., Nataraj, V., ... & Prakash, S. (2021). Development of an intelligent laser biospeckle system for early detection and classification of soybean seeds infected with seed-borne fungal pathogen (*Colletotrichum truncatum*). *Biosystems Engineering*, 212, 442-457.

Smith, J. L., & Doran, J. W. (1997). Measurement and use of pH and electrical conductivity for soil quality analysis. *Methods for assessing soil quality*, 49, 169-185.

Smith, L. B., Downs, R. J. & Klein, R. M. (1988). Euforbiáceas. Flora ilustrada catarinense (R. Reitz, ed.). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1-408.

Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Sohi, G. S., Singh, A., Singh, B., & Beniwal, M. (2020). Effect of sowing date and weather parameters on severity of *Alternaria* blight on different varieties of *Brassica juncea*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(7), 3732-3739.

Spurr, H.W. (1975). Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. *Phytopathology*. 65:417.

Stanton, M. L. (2003). Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *The American Naturalist*, 162(S4), S10-S23.

Stevenson, F. J., & Cole, M. A. (1999). Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. *John Wiley & Sons*

Stevenson, F. J., & Fitch, A. (1986). Chemistry of complexation of metal ions with soil solution organics. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, 17, 29-58.

Stewart J.E., Thomas K.A., Lawrence C.B., Dang H., Pryor B.M., et al. (2013). Signatures of recombination in clonal lineages of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata* sensu lato. *Phytopathology*.103:741–749

Stone J.K. (1988). Fine structure of latent infection by *Rhabdocline Parkeri* on Douglas fir, with observation on uninfected epidermal cells. *Canadian Journal of Botany*. 66:45-54.

Strobel, G. A. (2018). *Fungal Endophytes in Plants*. Basel, Switzerland: MDPI.

Šurić, J., Brandić, I., Peter, A., Bilandžija, N., Leto, J., Karažija, T., ... & Voća, N. (2022). Wastewater Sewage Sludge Management via Production of the Energy Crop *Virginia Mallow*. *Agronomy*, 12(7), 1578.

Suryanarayanan, T. S., & Shaanker, R. U. (2021). Can fungal endophytes fast-track plant adaptations to climate change?. *Fungal Ecology*, 50, 101039.

Suryanarayanan, T. S., & Vijaykrishna, D. (2001). Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity*.

Sutton, B. C. (1980). The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. *Commonwealth Mycological Institute*.

Swift, R. S. (2001). Sequestration of carbon by soil. *Soil science*, 166(11), 858-871

Taghavi, S., Weyens, N., Vangronsveld, J., & Lelie, D. V. D. (2011). Improved phytoremediation of organic contaminants through engineering of bacterial endophytes of trees. In *Endophytes of forest trees* (pp. 205-216). Springer, Dordrecht.

Takase, M., Zhao, T., Zhang, M., Chen, Y., Liu, H., Yang, L., & Wu, X. (2015). An expatiate review of neem, *Jatropha curcas*, rubber and karanja as multipurpose non-edible biodiesel resources and comparison of their fuel, engine and emission properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 495-520.

Teixeira, L. H., Yannelli, F. A., Ganade, G., & Kollmann, J. (2020). Functional diversity and invasive species influence soil fertility in experimental grasslands. *Plants*, 9(1), 53.

Tejesvi, M. V., & Pirttilä, A. M. (2018). Potential of tree endophytes as sources for new drug compounds. *Endophytes of Forest Trees* (pp. 441-462).

Thomas, G. W. (1996). Soil pH and soil acidity. *Methods of soil analysis: part 3 chemical methods*, 5, 475-490.

Thomma, B. P. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular plant pathology*, 4(4), 225-236.

Turner, B. L., Cade-Menun, B. J., & Westermann, D. T. (2003). Organic phosphorus composition and potential bioavailability in semi-arid arable soils of the western United States. *Soil Science Society of America Journal*, 67, 1168-1179.

van der Putten, W. H. (2003). Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology*, 84(9), 2269-2280. doi:10.1890/02-0284

van der Putten, W. H., Bardgett, R. D., Bever, J. D., Bezemer, T. M., Casper, B. B., Fukami, T., ... Wardle, D. A. (2013). *Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges*. *Journal of Ecology*, 101(2), 265–276. doi:10.1111/1365-2745.12054

van Der Putten, W. H., Bardgett, R. D., de Ruiter, P. C., Hol, W. H. G., Meyer, K. M., Bezemer, T. M., ... & Wardle, D. A. (2009). Empirical and theoretical challenges in aboveground–belowground ecology. *Oecologia*, 161(1), 1-14.

van der Putten, W. H., Bradford, M. A., Pernilla Brinkman, E., van de Voorde, T. F., & Veen, G. F. (2016). Where, when and how plant–soil feedback matters in a changing world. *Functional Ecology*, 30(7), 1109-1121. doi: 10.1111/1365-2435.12657

van Grunsven, R. H., Van Der Putten, W. H., Bzemer, T. M., Tamis, W. L., Berendse, F., & Veenendaal, E. M. (2007). Reduced Plant-Soil Feedback of Plant Species Expanding Their Range as Compared to Natives. *Journal of Ecology*, 1050-1057.

van Ruijven, J., Ampt, E., Francioli, D., & Mommer, L. (2020). Do soil-borne fungal pathogens mediate plant diversity–productivity relationships? Evidence and future opportunities. *Journal of Ecology*, 108(5), 1810-1821.

Varga, T., Hixson, K. K., Ahkami, A. H., Sher, A. W., Barnes, M. E., Chu, R. K., ... & Doty, S. L. (2020). Endophyte-promoted phosphorus solubilization in *Populus*. *Frontiers in plant science*, 11, 567918.

Vargas, T. J., Pico, J. T., & Caicedo, C. (2019). Poster: Efecto de medios de cultivo enriquecidos con sustrato de pencas de pitahaya (*Hylocereus Megalanthus*) para acelerar el crecimiento de *Alternaria* spp.

Vaz, A. B. M., Fontenla, S., Rocha, F. S., Brandão, L. R., Vieira, M. L., De García, V., Goes-Neto, A., Rosa, C. A. (2014). Fungal endophyte β -diversity associated with *Myrtaceae* species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal Ecology*. 8, 28–36.

Vignale, M. V., Iannone, L. J., Scervino, J. M., Novas, M. V. (2018). *Epichloë* exudates promote in vitro and in vivo arbuscular mycorrhizal fungi development and plant growth. *Plant and Soil*. 422, 267–281

Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 952.

Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., & Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 36-43.

Walkley, A., Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37, 29–38.

Wang, H., Guo, Y., Luo, Z., Gao, L., Li, R., Zhang, Y., Kalaji, H. M., et al. (2022). Recent Advances in *Alternaria* Phytotoxins: A Review of Their Occurrence, Structure, Bioactivity, and Biosynthesis. *Journal of Fungi*, 8(2), 168.

Wardle, D. A., Bonner, K. I., Barker, G. M. (2002). Linkages between plant litter decomposition, litter quality, and vegetation responses to herbivores. *Functional Ecology*, 16(5), 585-595. doi: 10.1046/j.1365-2435.2002.00659.x.

White SM, George SC, Choi B (2011) Automated computation of functional vascular density using laser speckle imaging in a rodent window chamber model. *Microvascular Research* 82 (1):92-95.

Williams, F., Eschen, R., Harris, A., Djeddour, D., Pratt, C., Shaw, R. S., ... & Murphy, S. T. (2010). The economic cost of invasive non-native species on Great Britain. *CABI Proj No VM10066*, 199. Zhong, R., Zhang, L., & Zhang, X. (2022). Allelopathic Effects

of Foliar Epichloë Endophytes on Belowground Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Meta-Analysis. *Agriculture*, 12(11), 1768

Wilson, D. (1995). Fungal endophytes which invade insect galls: insect pathogens, benign saprophytes, or fungalinquilines? *Oecologia*, 103(2), 255-260.

Wiriya, J., Rangjaroen, C., Teaumroong, N., Sungthong, R., & Lumyong, S. (2020). Rhizobacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi of Oil Crops (Physic Nut and Sacha Inchi): A Cultivable-Based Assessment for Abundance, Diversity, and Plant Growth-Promoting Potentials. *Plants*, 9(12), 1773.

Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in mycology*, 75(1), 171-212.

Yuan, Z. L., Rao, L. B., Chen, Y. C., Zhang, C. L., & Wu, Y. G. (2011). From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzuensis*. *Fungal Biology*, 115(3), 197-213.

Zdunek A, Adamiak A, Pieczywek PM, Kurenda A (2014) The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: A review. *Optics and Lasers in Engineering* 52:276-285.

Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., et al. (2014). Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*. 72:98–108.

Zhong X, Wang X, Cooley N, Farrell PM, Foletta S, Moran B (2014) Normal vector based dynamic laser speckle analysis for plant water status monitoring. *Optics Communications* 313:256-262.

Zhong, R., Xia, C., Ju, Y., Zhang, X., Duan, T., Nan, Z., & Li, C. (2021). A foliar *Epichloë* endophyte and soil moisture modified belowground arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity associated with *Achnatherum inebrians*. *Plant and Soil*, 458(1), 105-122.

Zhou, L. S., Tang, K., & Guo, S. X. (2018). The plant growth-promoting fungus (PGPF) *Alternaria* sp. A13 markedly enhances *Salvia miltiorrhiza* root growth and active ingredient accumulation under greenhouse and field conditions. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 270.

Zhou, Y., Li, X., Gao, Y., Liu, H., Gao, Y. B., van der Heijden, M. G., & Ren, A. Z. (2018) Plant endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi alter plant competition. *Functional Ecology*, 32(5), 1168-1179.

Zwickel, T., Kahl, S. M., Rychlik, M., & Müller, M. E. (2018). Chemotaxonomy of mycotoxigenic small-spored *Alternaria* fungi—do mult toxin mixtures act as an indicator for species differentiation? *Frontiers in microbiology*, 9, 1368.



Lic. María Fernanda D'Jonsiles



Dra. Cecilia Cristina Carmarán



Dra. María Victoria Novas