



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Evaluación de la interacción entre endofitos *Epichloë* y
endofitos septados oscuros y su impacto sobre la
gramínea *Bromus auleticus***

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad
de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Natalia Luisa Terlizzi

Directora de Tesis: Dra. María Victoria Novas

Co-Directora de Tesis: Dra. María Alejandra Rodríguez

Consejero de Estudios: Dr. Leopoldo Iannone

Lugar de trabajo: INMIBO-CONICET. FCEN.UBA

Fecha de presentación: Buenos Aires, 2024

Evaluación de la interacción entre endofitos *Epichloë* y endofitos septados oscuros y su impacto sobre la gramínea *Bromus auleticus*

RESUMEN

Las plantas establecen asociaciones simultáneas con múltiples simbiontes, sin embargo, queda todavía mucho por explorar en lo referente al efecto de estas interacciones, particularmente en plantas silvestres. Algunas gramíneas C3, incluyendo las principales forrajeras invernales, se asocian a endofitos del género *Epichloë*. Tanto las especies de interés agronómico como las nativas silvestres, infectadas por estos endofitos (E+) presentan ventajas en cuanto a la germinación de semillas, desarrollo de biomasa y resistencia a la sequía. Los endofitos *Epichloë* también pueden modular la abundancia, diversidad, colonización y desarrollo de microorganismos rizosféricos y simbiontes de raíz. Otro grupo de simbiontes fúngicos de interés, asociados a las raíces, es el de los endofitos septados oscuros, conocidos como hongos DSE (*dark septate endophytes*). Debido a su heterogeneidad y los pocos estudios de interacción en relación con el número de taxones incluidos en este grupo y el amplio rango de hospedantes, aún no se ha establecido el tipo de asociación que mantienen con las plantas, pero existe un amplio consenso acerca del importante papel de estos hongos en los ecosistemas. Esta tesis está centrada en contribuir al conocimiento de la interacción simultánea entre los endofitos *Epichloë* y los endofitos DSE en asociación a *Bromus auleticus*, una gramínea silvestre con potencial forrajero. Para esto, se identificaron molecularmente 29 cepas de DSE aisladas de raíces de plantas E+ y E- de *B. auleticus*, lo que permitió analizar la riqueza y diversidad de las cepas en relación al estatus endofítico del hospedante. Con el objetivo de confirmar el tipo de asociación que las cepas de hongos DSE establecen con *B. auleticus*, se realizaron ensayos *in vitro* de resíntesis. Para identificar caracteres de interés en las cepas de DSE, se realizó un screening en medio sólido NBRIP para seleccionar aquellas cepas de DSE endofíticas con capacidad de solubilizar P. Las que arrojaron resultados positivos fueron evaluadas en un estudio en medio líquido NBRIP, donde se emplearon diferentes fuentes de P y se cuantificó la solubilización. También se correlacionó la tasa de crecimiento de las cepas con su naturaleza endofítica y patrón de colonización radical y se evaluó una cepa en dos etapas de desarrollo de

B. auleticus. Finalmente, con el objetivo de analizar de manera simultánea la respuesta del hospedante a la asociación con endofitos *Epichloë*, endofitos DSE y a la adición de P al sustrato, se realizó un ensayo *in vivo* en el campo experimental donde se seleccionó la cepa de DSE con mayor capacidad para solubilizar P. Los resultados más relevantes muestran una mayor diversidad y riqueza de cepas de DSE, asociadas a plantas E+, respecto a las plantas E-, por lo que se propone que los endofitos de vástago *Epichloë* favorecen el establecimiento de cepas de DSE. El estudio de esta Tesis refleja la complejidad de las interacciones múltiples. Siendo que *Epichloë* podría modular la diversidad de hongos DSE asociada a las raíces de *B. auleticus* y la asociación simultánea de este con hongos DSE tiene un efecto positivo sobre el crecimiento del hospedante.

Palabras claves: endofitos, *Epichloë*, DSE, *Bromus auleticus*, hongos solubilizadores de fósforo.

Evaluation of the interaction between *Epichloë* endophytes and dark septate endophytes and their impact on the grass *Bromus auleticus*

ABSTRACT

Plants establish simultaneous associations with multiple symbionts, however, much remains to be explored regarding the effect of these interactions, particularly in wild plants. Some C3 grasses, including the major winter forages, associate with endophytes of the genus *Epichloë*. Both species of agronomic interest and wild natives infected by these endophytes (E+) show advantages in terms of seed germination, biomass development and drought resistance. *Epichloë* endophytes can also modulate the abundance, diversity, colonization and development of rhizospheric microorganisms and root symbionts. Another group of fungal symbionts of interest, associated with roots, is the dark septate endophytes, known as DSE (*dark septate endophytes*) fungi. Due to their heterogeneity and the few interaction studies in relation to the number of taxa included in this group and the wide range of hosts, the type of association they maintain with plants has not yet been established, but there is a broad consensus about the important role of these fungi in ecosystems. This thesis is focused on contributing to the knowledge of the simultaneous interaction between *Epichloë* endophytes and DSE endophytes in association with *Bromus auleticus*, a wild grass with forage potential. For this purpose, 29 DSE strains isolated from roots of E+ and E- plants of *B. auleticus* were molecularly identified, which allowed us to analyze the richness and diversity of the strains in relation to the endophytic status of the host. In order to confirm the type of association that DSE fungal strains establish with *B. auleticus*, *in vitro* resynthesis assays were performed. To identify traits of interest in the DSE strains, a screening in solid NBRIP medium was carried out to select those endophytic DSE strains with the ability to solubilize P. Those with positive results were evaluated in a study in liquid NBRIP medium, where different P sources were used and solubilization was quantified. The growth rate of the strains was also correlated with their endophytic nature and radical colonization pattern, and a strain was evaluated in two stages of development of *B. auleticus*. Finally, in order to simultaneously analyze the host response to the association with *Epichloë* endophytes, DSE endophytes and the addition of P to the substrate, an *in vivo* assay was performed in the experimental field where the DSE strain with the highest capacity to solubilize P was selected. The

most relevant results show a greater diversity and richness of DSE strains, associated with E+ plants, with respect to E- plants, so it is proposed that *Epichloë* stem endophytes favor the establishment of DSE strains. The study of this Thesis reflects the complexity of multiple interactions. Being that *Epichloë* could modulate the diversity of DSE fungi associated with *B. auleticus* roots and the simultaneous association of it with DSE fungi has a positive effect on host growth.

Key words: endophytes, *Epichloë*, DSE, *Bromus auleticus*, phosphorus solubilizing fungi.

Agradezco profundamente a mis directoras, Dra. Viky Novas y Dra. Ale Rodríguez, quienes confiaron en mí no solo para realizar la Tesina de Licenciatura, sino también para continuar con un Doctorado que hoy queda plasmado en esta Tesis. Me brindaron la oportunidad de seguir aprendiendo y formarme en el ámbito académico. No solo me han acompañado en este proceso, sino también en lo personal, siendo un apoyo fundamental y el motor que me impulsó durante los últimos meses.

Al Dr. Leo Iannone, por sus consejos y por confiar en mí.

A los jurados, Dra. Marta Rivera, Dra. Viviana Chiochio y el Dr. Luis Perez, por la buena predisposición para evaluar esta Tesis.

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme una beca para mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, quienes hacen que el ambiente laboral sea agradable y así más llevadero cuando los ensayos no salen como se espera o simplemente cuando los días no son los mejores. El labo 69 se convirtió en mi cable a tierra. Por los consejos científicos, por las risas y complicidades compartidas. ¡Gracias! Euju Lanari, Dani Ruiz Minguez, Lean Laino, Flor Sabena, Carla Martinotto, Martín Díaz, Ailén, Pato Mc Cargo, Ivana Della Mónica, Pablo Stefannoni, Vane Tossi, Gaby Zabaleta Male, Fernan y Anita.

Al grupo del Labo 5, Ceci Carmarán, Ro Gaisser, Gaby Atonatty, Caro Robles, Esteban Ceriani, Axel, Erika.

A los integrantes de los laboratorios 6, 7, 8, 9 y 70, por el compañerismo, la buena predisposición y contribuir a un ambiente de trabajo colaborativo y agradable.

A Malu Maldonado y Dianita, por brindarme su ayuda.

A Nerina Fischer por su buena predisposición y ayuda.

A Marina Recchi, por su calidez y ayudarme siempre que lo necesité.

A mis amigas incondicionales Andre y Gime.

A mi amor Leo, quien me acompaña, arenga y sostiene. Por el futuro juntos. Te amo.

A Luisa y Norberto, mis padres, que me cuidaron tanto e hicieron que está profesión hoy sea mi motor. Mamá, por tu fortaleza, constancia y ser nuestro norte. Papá, por tu amor incondicional, y todo lo que me enseñaste, me acompañas en cada paso y así soy más fuerte. Los amo.

A Stella, Nicolás, Valeria, Sebastián, Roxana, Cristina, Nico, Carlos, Miriam, Angélica, Alberto, Mayra, Graciela, Vicente, Toto, Rosi, Marcelo. Gracias por estar.



*“He aprendido a querer a los miembros de esta comunidad complicada. La ciencia es un oficio digno. Cada mañana, abstraídos, capturados, tomados por preguntas que sólo podrían compartir con un reducidísimo número de personas, casi siempre ajena a sus mundos afectivos, enfrentan una tarea cuya cotidianidad es el fracaso. Al ser interrogados fuera del ambiente laboral acerca de sus actividades, suelen sentir que sus problemas son infinitamente pequeños. Ensayan, con suerte diversa, especular con aplicaciones más o menos remotas de su saber. La sensación de ser parte de un esfuerzo colectivo para generar conocimiento está extendida, pero tanto como la convicción de que la contribución propia queda escondida en algún pliegue inaccesible del gran tejido. Hay un secreto, entonces, que da cuenta de la obcecación del deseo de hacer ciencia. Hay una fuerza motora que, creo profundamente, da ánimo durante los largos días de fracaso y hastío. **A veces, pasa ciencia.** Ocurre muy de tanto en tanto, pero la sensación es indescriptible. Es un momento en el que el investigador siente, con una convicción visceral, que le ha sido revelado un secreto. Ese momento de intimidad con la naturaleza, me parece, es el verdadero motor de este oficio”*

Gabriel Mindlin, *Causas y Azares*.

ÍNDICE

INTRODUCCION GENERAL	15
<i>Endofitos de vástago Epichloë</i>	17
<i>Ciclo de vida</i>	18
<i>Distribución</i>	20
<i>Asociación gramínea-Epichloë</i>	23
<i>Efecto de Epichloë sobre gramíneas nativas</i>	24
<i>Endofitos de raíz: hongos DSE</i>	25
<i>Generalidades</i>	25
<i>Estructuras características</i>	25
<i>Primeras Observaciones</i>	27
<i>Distribución</i>	28
<i>Reproducción</i>	29
<i>Colonización del hospedante</i>	30
<i>Efectos sobre el hospedante: crecimiento y nutrición</i>	31
<i>Interacciones múltiples Epichloë-Bromus auleticus- DSE</i>	37
<i>El fósforo su rol esencial en la nutrición y desarrollo vegetal</i>	38
<i>Hongos solubilizadores de fósforo y Epichloë</i>	40
<i>Forrajera Bromus auleticus</i>	42
HIPÓTESIS	44
OBJETIVOS	45
CAPÍTULO 1: Efecto de la asociación <i>Bromus auleticus-Epichloë</i> sobre la diversidad y abundancia de endofitos septados oscuros (DSE) en la raíz	47
INTRODUCCIÓN	48
<i>Continuo mutualismo-parasitismo</i>	48

<i>Rango de respuestas de las plantas a los hongos DSE</i>	49
<i>Colonización de la planta hospedante: Importancia de los ensayos de resíntesis</i>	51
<i>Identificación y diversidad de los hongos DSE</i>	52
<i>Diversidad de los hongos DSE en Argentina</i>	55
HIPÓTESIS PARCIALES	57
OBJETIVOS PARCIALES	57
MATERIALES Y MÉTODOS	59
<i>Ensayo de resíntesis</i>	59
<i>Identificación de los aislamientos fúngicos de DSE</i>	60
<i>Ánalysis de la diversidad y la riqueza</i>	62
RESULTADOS	64
<i>Identificación de los aislamientos fúngicos de DSE</i>	64
<i>Ensayo de Resíntesis</i>	67
<i>Diversidad y Riqueza</i>	70
<i>Ánalysis de correlación de estatus vs especies</i>	71
<i>Ánalysis multivariado</i>	71
DISCUSIÓN	74
<i>Cepas endofíticas</i>	74
<i>Cepas patogénicas</i>	76
<i>Rol dual de las cepas DSE: endofítico y patogénico en sistemas planta-microorganismo</i>	78
<i>Diversidad</i>	85
CONCLUSIONES PARCIALES	88
CAPÍTULO 2: Caracterización de las cepas de los DSE. Interacción con endofitos <i>Epichloë</i>.	89
INTRODUCCIÓN	90
<i>Los DSE como solubilizadores de Fósforo</i>	91

<i>Principales resultados a nivel mundial</i>	91
<i>DSE solubilizadores de P en Argentina</i>	93
<i>Análisis de caracteres de DSE asociados a estrategias nutricionales</i>	94
<i>Exudados de raíces</i>	96
HIPÓTESIS PARCIALES	99
OBJETIVOS PARCIALES	99
MATERIALES Y MÉTODOS	100
<i>Evaluación de la capacidad de solubilizar de fósforo de las cepas de DSE</i>	
<i>Procedimiento</i>	100
<i>Condiciones de crecimiento, cosecha y curva de calibración</i>	101
<i>Ensayo de solubilización con 3 fuentes de fósforo</i>	101
<i>Ensayo de solubilización con 3 fuentes de fósforo</i>	102
<i>Análisis estadístico</i>	103
<i>Evaluación de la correlación entre el patrón de colonización, la tasa de crecimiento y estrategia nutricional</i>	103
<i>Tasa de crecimiento intrínseca</i>	103
<i>Colonización de raíces</i>	104
<i>Análisis estadísticos</i>	104
<i>Efecto de los endofitos <i>Epichloë</i> sobre el desarrollo in vitro de cepas de DSE</i>	
<i>Aislamiento <i>Epichloë</i> a partir de plantas bajo estudio</i>	105
<i>Exudados de <i>Epichloë platensis</i></i>	105
<i>Efecto de los exudados de <i>Epichloë</i> en el crecimiento de DSE</i>	105
<i>Ensayo principal</i>	106
<i>Análisis Estadísticos</i>	107
<i>Evaluación del efecto de una cepa de <i>Setophoma terrestris</i> en plantas adultas de <i>Bromus auleticus</i> asociadas a <i>Epichloë</i></i>	108

<i>Procedimiento</i>	108
<i>Estatus endofítico de Epichloë</i>	110
<i>Diseño Experimental y Análisis estadístico</i>	110
RESULTADOS	112
<i>Capacidad de la solubilización de fósforo en medio sólido de las cepas de DSE</i>	112
<i>Capacidad de la solubilización <i>Thelonectria blackeriella</i> en medio líquido</i>	114
<i>Capacidad de la solubilización de <i>Thelonectria blackeriella</i> a partir de diferentes fuentes de fósforo</i>	115
<i>Evaluación de la estrategia nutricional, tasas de crecimiento y patrones de colonización de las cepas de DSE</i>	117
<i>Efecto de los endofitos <i>Epichloë</i> sobre el desarrollo <i>in vitro</i> de cepas de DSE</i>	123
<i>Evaluación del efecto de una cepa de <i>Setophoma terrestris</i> sobre plantas adultas de <i>Bromus auleticus</i> asociadas a <i>Epichloë</i></i>	140
<i>Parámetros de crecimiento de las plantas</i>	140
<i>Colonización de raíces</i>	143
DISCUSIÓN	146
<i>Solubilización de P</i>	146
<i>Cuantificación de la solubilización de P</i>	147
<i>Estudio integrado de diversos parámetros de desarrollo, el estatus de la planta de origen y estrategia nutricional de las cepas de DSE</i>	148
<i>Efecto de los endofitos <i>Epichloë</i> sobre el desarrollo <i>in vitro</i> de cepas de DSE</i>	152
<i>Impacto de <i>Setophoma terrestris</i> en el desarrollo de planta adultas de <i>Bromus auleticus</i> asociadas a <i>Epichloë platensis</i></i>	154

CONCLUSIONES PARCIALES	159
CAPÍTULO 3: Inoculación de <i>Thelonectria blackeriella</i> en plantas de <i>B. auleticus</i> asociadas o no al endófito <i>Epichloë</i>. Ensayo en invernáculo	160
INTRODUCCIÓN	161
HIPÓTESIS PARCIALES	166
OBJETIVOS PARCIALES	166
MATERIALES Y MÉTODOS	167
<i>Diseño experimental</i>	<i>167</i>
<i>Preparación de macetas y mantenimiento</i>	<i>168</i>
<i>Preparación del inóculo</i>	<i>169</i>
<i>Parámetros de crecimiento</i>	<i>170</i>
<i>Concentración de fósforo en planta</i>	<i>170</i>
<i>Colonización de <i>Thelonectria blackeriella</i></i>	<i>171</i>
<i>Re-aislamiento de <i>T. blackeriella</i></i>	<i>171</i>
<i>Estatus endofítico de <i>Epichloë</i></i>	<i>172</i>
<i>Ánálisis estadísticos</i>	<i>172</i>
<i>Parámetros de crecimiento y concentración de fósforo en planta</i>	<i>172</i>
<i>Colonización de la raíz</i>	<i>173</i>
<i>Correlación de variables</i>	<i>174</i>
RESULTADOS	175
<i>Unidades Formadoras de Colonias</i>	<i>175</i>
<i>Parámetros de crecimiento de las plantas</i>	<i>176</i>
<i>Fósforo en planta</i>	<i>182</i>
<i>Colonización de las raíces</i>	<i>183</i>
<i>Re-aislamiento de <i>T. blackeriella</i></i>	<i>188</i>
<i>Estatus endofítico de <i>Epichloë</i></i>	<i>188</i>
<i>Correlación entre variables de crecimiento y concentración de fósforo</i>	

<i>en planta</i>	188
<i>Correlación entre variables de crecimiento y estructuras de colonización de <i>T. blackeriella</i></i>	189
<i>Correlación entre variables de crecimiento, fósforo y estructuras de <i>T. blackeriella</i></i>	190
DISCUSIÓN	192
<i>Colonización de las raíces por <i>Thelonectria blackeriella</i></i>	192
<i>Concentración de fósforo en los tejidos aéreos de las plantas</i>	194
<i>Efecto de interacción <i>Epichloë</i>-DSE sobre parámetros de crecimiento de <i>B. auleticus</i></i>	196
CONCLUSIONES PARCIALES	202
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA	210
ANEXO	244

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de *Bromus auleticus* asociado a *Epichloë* **A.** presencia de hifas en vástago y **B.** hifas en semilla. En ambos casos teñidas con azul de anilina para facilitar su observación al microscopio óptico A: 400X.....18

Fig. 2. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. Transmisión vertical. Modificado de Iannone *et al.*, 2021.....20

Fig. 3. Distribución de las especies de la subfamilia Pooidea en Sudamérica, Resaltado la distribución de *Bromus auleticus*. Modificado de Iannone *et al.*, (2021).....22

Fig 4. Estructuras características de los DSE. Hifas septadas oscuras (flechas) y microesclerocios (M) en raíz de *Bromus auleticus*. A: 400X.....31

Fig 5. Los efectos de la colonización de DSE en la aptitud de las plantas afectadas por metales pesados y sequía. Las DSE favorecen el crecimiento de las plantas mejorando su nutrición. A cambio del carbono (C) derivado de las plantas, los DSE descomponen eficientemente el sustrato del suelo incrementando el conjunto de nutrientes (P y N) disponibles para las plantas **(a)**. Los DSE protegen a las plantas de los metales pesados (HM), ya sea por su inmovilización directa por las hifas fúngicas o favoreciendo su secuestro en las paredes celulares de las plantas, reduciendo la reserva soluble de HM **(b)** y su posterior translocación al tejido vascular de las raíces y los brotes **(c)**. Los DSE aumentan la tolerancia de las plantas a la sequía y la salinidad mejorando las propiedades hidráulicas de las raíces. Las plantas colonizadas por DSE producen raíces más largas de menor diámetro y mayor biomasa, caracterizadas por un intercambio iónico y una absorción de agua eficientes **(d)**. Además, la presencia de DSE en plantas afectadas por la sequía mejora la conductancia estomática, el intercambio de gases y la transpiración **(e)**. Las asociaciones mutuas entre las DSE y las plantas favorecen la fisiología vegetal, aumentando el contenido de clorofila, la tasa de fotosíntesis y la producción de fitohormonas, como la auxina (IAA) y el ácido abscísico (ABA), así como los mecanismos de defensa de las plantas, como la producción de osmolitos, enzimas antioxidantes y metabolitos secundarios **(f)**. La exposición de plantas no colonizadas por el DSE a la sequía y al HM provoca su baja biomasa, clorosis, aumento del daño oxidativo y pérdida de transpiración **(g)**. Modificado de Malicka *et al.*, (2022).....35

Fig 6. Esquema que resume los efectos de los hongos endofíticos bajo el suelo sobre la colonización de las raíces de los HMA y la eficiencia de la simbiosis, la absorción de P y la reducción del estrés de la planta basado en experimentos *in vivo*. Hongos micorrílicos arbusculares (HMA); endofito septado oscuro (DSE); micelio extrarradical (MER); hongos solubilizadores de fósforo (HSF).....41

Fig. 7. Plantas de *Bromus auleticus* en el campo experimental de la FCEN-UBA. **A.** Vista general de la planta. **B.** En estado de antesis. **C.** Con semillas. Fotos tomadas por Daniel Ruiz Mínguez y Natalia Terlizzi.....42

Fig. 8. Esquema general de los grupos funcionales aéreos y subterráneos de los endófitos fúngicos: (1) *Epichloë* en la semilla (transmisión vertical). (2) Endofitos *Epichloë* creciendo en tallos y hojas. (3) DSE, en las raíces. Todos ellos interactúan simultáneamente dentro de la misma planta. DSE, endofito septado oscuro. Modificado de Della Monica *et al.*, (2021).....43

Fig. 1.1 Esquema de la metodología a seguir para identificación de cepas DSE y ensayo de resíntesis.....62

Fig 1.2. Cepas DSE aisladas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* e identificadas molecularmente como A. *Setophoma terrestris* B. *Microdochium bolleyi* C. *Magnaportheopsis* sp. D. *Simplicillium lamellicola* E. *Thelonectria blackeriella* F. *Epicoccum* sp. G. *Poaceascoma helicoides* H. *Microdochium trichocladiopsis* I. *Periconia macrospinosa* J. *Hymenoscyphus* sp. K. *Dactylonectria* sp.....64

Fig 1.3. Cepas DSE aisladas de <i>Bromus auleticus</i> no asociadas a <i>Epichloë</i> e identificadas molecularmente como A. <i>Setophoma terrestris</i> B. <i>Tetraplosphaeria</i> sp. C. <i>Herpotrichia</i> sp. D. <i>Exophiala tremulae</i> E. <i>Periconia macrospinosa</i> F. <i>Poaceascoma helicoides</i> G. <i>Microdochium bolleyi</i>	65
Fig 1.4. Árbol filogenético construído con el método de Máxima Verosimilitud, a partir de aislamientos de endofitos septados oscuros (DSE), de las raíces de <i>B. auleticus</i> , asociadas o no a <i>Epichloë</i> , basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: General Reversible en el Tiempo. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: <i>Rhizopus microsporus</i>	66
Fig 1.5. Etapas del ensayo de resíntesis, inoculación de las plántulas mediante el contacto de las raíces con la colonia fúngica. Luego, trasplante a tubos de ensayos con vermiculita como sustrato de crecimiento. Incubación en cámara a 24 °C con fotoperíodo de 16 hs luz/8hs oscuridad durante 30 días. Finalmente se evaluó el estado general de la plántula y se tiñeron las raíces para observar estructuras fúngicas.....	67
Fig 1.6. Abundancia de géneros/especies de acuerdo al estatus endofítico de las plantas de origen. Los números entre paréntesis indican el número de aislamientos por estatus.....	70
Fig. 1.7. Matriz de correlación entre variables especies y el estatus endofítico de la planta de origen. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 14 datos entre las variables: Estatus, correspondiente a la planta de origen. <i>Setophoma terrestris</i> . <i>Epicoccum</i> sp. <i>Herpotrichia</i> sp. <i>Periconia macrospinosa</i> . <i>Poaceascoma helicoides</i> . <i>Tetraplosphaeria</i> sp. <i>Hymenoscyphus</i> sp. <i>Microdochium bolleyi</i> . <i>Microdochium trichocladiopsis</i> . <i>Exophiala tremulae</i> . <i>Magnaportheopsis</i> sp. <i>Dactylolectria</i> sp. <i>Thelonectria blackeriella</i> . <i>Simplicillium lamellicola</i> . Se extrajeron los valores de p que se expresan como: * p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).....	71
Fig 1.8. Análisis de componentes principales (PCA) realizado sobre 14 cepas de endofitos septados oscuros aislados plantas de <i>Bromus auleticus</i> asociadas a <i>Epichloë</i> (E+) y plantas no asociadas (E-). Los números representan las muestras de plantas. Las plantas numeradas 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 corresponden a E+ y las plantas numeradas; 8; 9; 11; 12; corresponden a E-.....	73
Fig. 2.1. Esquema de la metodología a seguir para los ensayos de solubilización de fósforo en medio sólido y medio líquido NBRIP.....	102
Fig. 2.2. Esquema del ensayo efecto de los exudados de <i>Epichloë</i> en el crecimiento de cepas de DSE. Primero se obtuvieron los exudados de <i>E. platensis</i> , posteriormente se realizó un ensayo preliminar, con dos cepas y finalmente un ensayo principal con 5 cepas total, algunas endofíticas y otras patogénicas.	107
Fig 2.3. Esquema de la metodología a seguir, para evaluar la patogenicidad de <i>Setophoma terrestris</i> en plantas adultas de <i>Bromus auleticus</i>	110
Fig. 2.4. Cepas solubilizadoras de fósforo en medio sólido NBRIP. A. <i>Thelonectria blackeriella</i> . B. <i>Magnaportheopsis</i> sp. C. <i>Microdochium bolleyi</i> . D. <i>Herpotrichia</i> sp. E. <i>Tetraplosphaeria</i> sp. F. <i>Poaceascoma helicoides</i> . A partir del ensayo de resíntesis (Capítulo 1) las cepas se clasificaron en endofíticas (verdes) y patogénicas (rojas).....	113
Fig 2.5. Curva de Crecimiento de <i>Thelonectria blackeriella</i> en medio líquido NBRIP, cuantificado como peso seco del micelio, y solubilización de TCP, cuantificada como P soluble.....	114
Fig 2.6. Curva de pH y P soluble de <i>Thelonectria blackeriella</i> en medio líquido NBRIP a distintos tiempos.....	115

Fig 2.7. Solubilización de fosfato de aluminio (FA), fosfato tricálcico (TCP) y fosfato ferroso (FF) (g/L) con respecto a la biomasa seca de *Thelonectria blackeriella* (g-1). Las barras corresponden a la media \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.....116

Fig 2.8.. Solubilización de *Thelonectria blackeriella* al día 5 de crecimiento en medio líquido NBRIP suplementado con 3 fuentes distintas de fósforo . **A.** Fosfato tricálcico (TCP), izquierda control sin inocular, derecha tratamiento con *T. blackeriella*. **B.** Fosfato de Aluminio (FA). **C.** Fosfato ferroso (FF). B y C, izquierda tratamiento con *T. blackeriella*, derecha control sin inocular.....117

Fig. 2.9. Matriz de correlación entre las variables estrategia nutricional, estatus endofítico, tasa de crecimiento intrínseca (r) y diámetro máximo alcanzado por la colonia. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 29 datos entre las variables: estrategia= estrategia nutricional, estatus=estatus endofítico de la planta de donde la cepa DSE fue aislada, r=tasa de crecimiento intrínseca, diam= diámetro máximo alcanzado por la colonia. Los valores de p que se expresan como: *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).....118

Fig. 2.10 Matriz de correlación entre las variables estrategia nutricional, estatus endofítico, tasa de crecimiento intrínseca (r) y diámetro máximo alcanzado por la colonia. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 8 datos entre las variables: estatus=estatus endofítico de la planta de donde el DSE fue aislado, estrategia= estrategia nutricional, HSH=hifas septadas hialinas, HSO=hifas septadas oscuras, M=microesclerocios y r=tasa de crecimiento intrínseca. Los valores de p que se expresan como: *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).....119

Fig 2.11. Análisis de componentes principales (PCA) realizado a partir de las variables hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO), microesclerocios (M), estrategia nutricional y la tasa de crecimiento intrínseca (r) de endofitos septados oscuros aislados plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) y plantas no asociadas (E-). Los números representan cepas de DSE. Las cepas numeradas corresponden a 1. *Thelonectria blackeriella* (C71A); 2. *Microdochium bolleyi* (C23A2); 3. *Periconia macrospinosa* (C87); 4. *Setophoma terrestris* (C53); 5. *Microdochium bolleyi* (C51); 6. *Hymenoscyphus* sp. (C54); 7. *Herpotrichia* sp. (CG5B) 8 *Microdochium bolleyi* (CG2). E+ o E- corresponde al estatus de planta aislada, mientras que E (endofítica) o P (patogénica) a la estrategia nutricional.....122

Fig. 2.13. Diámetros de las colonias de *M. bolleyi* (cepa 23A2) y *Setophoma terrestris* (cepa 53) en presencia de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0.5, 1.5, 3 y 6 %, V/V) al día 13 de crecimiento. Las barras de error representan el desvío estándar.....124

Fig. 2.14. Curvas de crecimiento de *Microdochium bolleyi* (cepa 23A2) cultivada en medio AEM suplementado con concentraciones del 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) de exudados de *Epichloë platensis*. Las barras de error representan el desvío estándar.....124

Fig. 2.15. Diámetro promedio (en cm) de colonias de *Microdochium bolleyi* (cepa 23A2) a diferentes tiempos de incubación en AEM con el agregado de diferentes concentraciones de exudados (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) obtenidos de *Epichloë platensis*. Los valores representan la media \pm error estándar (n = 5).125

Fig. 2.16. Cultivos de *Microdochium bolleyi* (cepa 23A2) en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo preliminar. A. Control. B. 0.5%. C. 1.5%. D. 3%. E. 6%.....126

Fig. 2.17. Curvas de crecimiento de *Setophoma terrestris* (cepa 53) cultivada en medio AEM suplementado con concentraciones del 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) de exudados de *Epichloë platensis*.....127

- Fig 2.18.** Diámetro promedio (en cm) de colonias de *Setophoma terrestris* (C53) en diferentes tiempos de incubación en AEM con el agregado de diferentes concentraciones de exudados (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) obtenidos de *Epichloë platensis*. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).....127
- Fig. 2.19.** Cultivos de *Setophoma terrestris* (cepa 53) en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo preliminar. A. Control. B. 0.5%. C. 1.5%. D. 3%. E. 6%.....128
- Fig. 20.2.** Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *M. bolleyi* (C23A2) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *M. bolleyi* a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5)...129
- Fig 2.21.** Cultivos de *M. bolleyi* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo principal. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 6 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 12 de crecimiento.....130
- Fig. 2.22.** Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *T. blackeriella* (C71A) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *Thelonectria blackeriella* (C71A) a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).....131
- Fig 2.23.** Cultivos de *T. blackeriella* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al al día 14 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 24 de crecimiento.....132
- Fig. 2.24.** Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *Herpotrichia* sp. (CG5B) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *Herpotrichia* sp. a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).....133
- Fig 2.25.** Cultivos de *Herpotrichia* sp. en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al al día 20 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 30 de crecimiento.....134
- Fig. 2.26.** Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *Setophoma terrestris* (C53) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *Setophoma terrestris* a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).....135
- Fig 2.27.** Cultivos de *S. terrestris* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 6 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 18 de crecimiento.....136
- Fig. 2.28.** Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *P. helicoides* (CE8) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *P. helicoides* a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).....137
- Fig 2.29.** Cultivos de *Poaceascoma helicoides* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha:

arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 6 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 20 de crecimiento.....138

Fig. 2.30. Diámetro promedio (en cm) de colonias de *Herpotrichia* sp.(CG5B), *Microdochium bolleyi* (C23a2), *Poacerascoma helicoides* (CE8), *Setophoma terrestris* (C53) y *Thelonectria blackeriella* (C71A) al día 12 de incubación en AEM con el agregado de diferentes concentraciones de exudados (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) obtenidos de *Epichloë plantesis*. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).....138

Fig 2.31. Cultivos de **A.** *Herpotrichia* sp., **B.** *Microdochium bolleyi*, **C.** *Poaceascoma helicoides*, **D.** *Setophoma terrestris*, **E.** *Thelonectria blackeriella*, al día 12 de crecimiento en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloe platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados.....139

Fig 2.32. Evaluación del estado general de la planta de *Bromus auleticus* inoculada con *Setophoma terrestris* (S+). Observación de síntomas en las raíces. Flecha gris, corresponde raíces con coloración rosada en plantas S+. Flecha verde, corresponde a raíz presencia de síntoma.....140

Fig. 2.33. Peso seco de vástago de plantas de 4 meses de edad de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas o no con la cepa 53 de *Setophoma terrestris* (*Setophoma* y Control, respectivamente).....141

Fig. 2.34. Peso seco de raíz de plantas de 4 meses de edad de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas o no con la cepa 53 de *Setophoma terrestris* (*Setophoma* y Control, respectivamente).....142

Fig. 2.35. Largo de hojas (cm) de plantas de 4 meses de edad de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas con la cepa 53 de *Setophoma terrestris* (*Setophoma*) o no (Control).143

Fig. 2.36. Colonización de raíces de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), por estructuras características de DSE, inoculadas o no con *S. terrestris* 53 (*Setophoma* y Control respectivamente). HSH: hifas septadas hialinas, HSO: Hifas septadas oscuras, M: Microesclerocios. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE). Las letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada variable analizada.....145

Fig 3.1. Esquema de los tratamientos realizados en el ensayo en maceta con *Bromus auleticus* e imagen de las plantas en el invernadero. Diseño experimental con tres factores: Estatus endofítico de *Epichloë* (E+, E-), estatus DSE (DSE+, DSE-) y Fósforo (P+, P-), dando como resultado 8 tratamientos con 15 réplicas cada uno.....167

Fig 3.2. Preparación del inóculo. Frascos con vermiculita y malta líquida sembrados con *Thelonectria blackeriella*. Izquierda sustrato al día de sembrado con la cepa DSE. Derecha, cultivo de 20 días con micelio ya desarrollado.....168

Fig 3.3. Placas de Petri de 15 cm ø con gotas de Gel-Gro, para aislamiento de la cepa inoculada a partir de trozos de 0,5 cm de raíces de *B. auleticus*.....171

Fig 3.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) correspondiente al inóculo de *T. blackeriella*. Diluciones: **A.** 1/10. **B.** 1/100. **C.** 1/1000. En cada caso se observa a la derecha el anverso y a la izquierda el reverso de cada placa de Petri.....174

Fig. 3.5. Largo de vástago en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media ± error

estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 175

Fig. 3.6. Peso fresco de vástago en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 176

Fig. 3.7. Peso fresco de raíz en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 177

Fig. 3.8. Peso seco de vástago en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 178

Fig. 3.9. Peso seco de raíz en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo en formato de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 179

Fig. 3.10. Índice de verdor en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 180

Fig 3.11. Plantas de *Bromus auleticus* al momento de la cosecha. Ocho tratamientos en total. Plantas asociadas o no a *Epichloë* (E+; E-), inoculadas o no con *T. blackeriella* (DSE+; DSE-) con el agregado o no de una fuente de fósforo (P+; P-) 181

Fig. 3.12.. Concentración de fósforo en el vástago de plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=5. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) 182

Fig. 3.13. Imágenes correspondientes a raíces de *Bromus auleticus* teñidas con Trypan Blue. Asociadas o no a *Epichloë* (E+/E-), inoculadas o no con *T. blackeriella* (DSE+/DSE-) y con el agregado o no de fósforo (P+/P-). Las imágenes **A, B, C y D**, corresponden a raíces de plantas **E-/DSE+/P+**. Las imágenes **E; F; G**, corresponden a raíces de plantas **E+/DSE+/P+**. Las imágenes **H; I**, corresponden a raíces de plantas **E-/DSE+/P-**. Las imágenes **J; K; L**, corresponden a raíces de plantas **E+/DSE+/P-**. **A-** Hifas septadas oscura (flecha blanca). **B-** Hifas septadas oscura (flecha blanca) y hialinas (flecha azul). **C-** Hifa septada oscura (flecha blanca). **D-** Hifa septada oscura (flecha blanca). **E-** Microesclerocio (M). **F-** Microesclerocio (M). **G-** Microesclerocio (M). **H-** Microesclerocio (M) e hifas septadas melanizadas (flecha). **I-** Hifa septada oscura (flecha). **J-** Hifa septada hialina (flecha azul). **K-** Microesclerocio hialino (M). **L-** Hifa septada oscura (flecha) y microesclerocio (M). A: 400x 183

Fig. 3.14. Colonización por hifas septadas hialinas en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE). Los valores

representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).....184

Fig. 3.15. Colonización por hifas septadas oscuras en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE).....185

Fig. 3.16. Colonización por microesclerocios en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE).....186

Fig 3.17. Diferentes etapas del re-aislamiento de la cepa inoculada a partir de raíces de *Bromus auleticus*. **A.** Trozos de raíces en gotas de Gel-Gro. **B.** Micelio emergiendo del interior de las raíces. Observación a lupa binocular A: 30 X. **C; D; E; F;** y **G.** Cultivos fúngicos que presentaron mayor frecuencia. **C** y **D.** *Thelonectria blackeriella*. **E.** Potencial *Fusarium* sp. **F.** Potencial *Trichoderma* sp. **G.** Morfotipo anaranjado.....187

Fig. 3.18. Matriz de correlación entre variables de crecimiento y concentración de fósforo en la planta. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 39 datos entre las variables: P= concentración (mg) de fósforo en el vástago, CL=índice de verdor, LV=largo de vástago, PFV= peso fresco de vástago, PFR=peso fresco de raíz, PSV=peso seco de vástago y PSR=peso seco de raíz. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).....188

Fig. 3.19. Matriz de correlación entre variables de crecimiento y estructuras de *T. blackeriella*. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 27 datos entre las variables: HSH=hifas septadas hialinas, HSO=hifas septadas oscuras, M=microesclerocios, CL=índice de verdor, LV=largo de vástago, PFR=peso fresco de raíz, PFV= peso fresco de vástago, PSV=peso seco de vástago y PSR=peso seco de raíz. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).....189

Fig. 3.20. Matriz de correlación entre variables de crecimiento, las estructuras de *T. blackeriella* y la concentración de P en la planta. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 14 datos entre las variables: P= concentración de P (mg) en el vástago, HSH=hifas septadas hialinas, HSO=hifas septadas oscuras, M=microesclerocios, CL=índice de verdor, LV=largo de vástago, PFR=peso fresco de raíz, PFV= peso fresco de vástago, PSV=peso seco de vástago y PSR=peso seco de raíz. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).....190

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de endofitos fúngicos según Rodríguez <i>et al.</i> , (2009). No adaptados al hábitat (NAH), hace referencia a beneficios como tolerancia a la sequía, incrementos en el crecimiento de la planta y producción de compuestos tóxicos que disminuyen la herbivoría. Adaptados al hábitat (AH) beneficios que producen tolerancia al estrés abiótico (pH, temperatura y salinidad) como resultado de presiones selectivas del hábitat.....	17
Tabla 1.1. Identificación y estatus endófitico de las cepas aisladas de plantas de <i>B. auleticus</i> E+ y E-, y sintomatología y colonización de DSE asociada a las plántulas durante la resíntesis. ID=identificación molecular usando los cebadores ITS4 e ITS5. HSH= hifas septadas hialinas, HSO = hifas septadas oscuras. El color verde se asoció a cepas endófiticas y el rojo a cepas patogénicas a partir del ensayo de resíntesis.....	67
Tabla 1.2.. Riqueza, índice de Shannon y Simpson asociados a plantas E+ y E-.....	70
Tabla 2.1. Cepas seleccionadas con capacidad de solubilizar P. (+++, ++, + simbolizan el diámetro del halo de solubilización, de mayor a menor).....	112
Tabla 2.2. Eigenvalores y Varianza Explicada del PCA realizado en 8 cepas de DSE.....	120
Tabla 2.3. Contribuciones (“species scores”) de cada variable en las tres primeras componentes. Estrategia nutricional (Estrategia), hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO), microesclerocios (M), tasa de crecimiento intrínseca (r).....	121

ABREVIATURAS

E+: con endofito

E-: sin endofito

DSE: endofito septado oscuro

DSE+: con endofito septado oscuro

DSE-: sin endofito septado oscuro

P: fósforo

N: nitrógeno

HSH: hifa septada hialina

HSO: hifa septada oscura

M: microesclerocios

PAC: Complejo *Phialocephala fortinii*-*Acephala applanata*

HMA: hongos micorrílicos arbusculares

HSF: hongos solubilizadores de fosfato

AEM: agar extracto malta

CEM: caldo extracto de malta

FHB: *Fusarium Head Blight*

NBRIP: National Botanical Research Institute Phosphate

TCP: fosfato tricálcico

FA: fosfato de aluminio

FF: fosfato ferroso

PDA: agar papa dextrosa

GA: Glucosa-asparagina

S+: inoculada con *Setophoma terrestris*

S-: no inoculada con *Setophoma terrestris*

P+: con fósforo

P-: sin fósforo

CL: índice de verdor

LV: largo de vástago

PFR: peso fresco de raíz

PFV: peso fresco de vástago

PSV: peso seco de vástago

PSR: peso seco de raíz

INTRODUCCIÓN GENERAL

La simbiosis se define como una relación "íntima" entre organismos de especies diferentes (Schulz *et al.*, 1998). Todas las plantas albergan diversos microorganismos, que pueden afectar su aptitud, y los resultados de cada interacción pueden ser variables y dependientes de las estrategias nutricionales y las fases de desarrollo de los simbiontes, así como de los factores ambientales (Schulz y Boyle 2005). Según el paradigma mutualismo-parasitismo, una interacción planta-microorganismo puede variar de mutualista a parasitaria (Barrow, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Mandyam y Jumpponen, 2015). En el escenario de simbiosis mutualista, en el que todos los socios se benefician, la planta proporciona al microorganismo refugio y compuestos de carbono (entre otros beneficios), y al mismo tiempo obtiene ciertos beneficios como el aumento de su vigor, mayor productividad y tolerancia al estrés. Además, los microorganismos beneficiosos que viven en el mismo hospedante pueden interactuar entre sí y con otros microorganismos de la comunidad.

De acuerdo con el registro fósil, la asociación entre hongos y plantas se remonta a principios del período Devónico (Taylor *et al.*, 2004, 2005, 2006). Este registro, proveniente del yacimiento conocido como Rhynie Chert, ubicado en Escocia, se caracteriza por el excelente estado de preservación del material encontrado. Su análisis ha permitido documentar la morfología y la biología del ciclo de vida de los hongos fósiles pertenecientes a varios grupos taxonómicos importantes. Representantes de tres Phylum de hongos (Chytridiomycota – Krispiromyces, Paloblastocladia-, Glomeromycota, Ascomycota) y del Phylum Oomycota (Taylor *et al.*, 2006), han sido estudiados con gran detalle en este paleoecosistema. Estos estudios constituyen un documento fundamental que muestra las primeras interacciones entre plantas terrestres y hongos (Krings *et al.*, 2007). Según Taylor *et al.*, (2004) las interacciones en este yacimiento involucran tanto a algas verdes como a plantas vasculares, con ejemplos de saprofitismo, parasitismo y mutualismo, incluidas las primeras asociaciones de micorrizas y simbiosis de líquenes conocidas hasta la fecha. Sin embargo, debido a la complejidad de las asociaciones que involucran a varios hongos que establecen relaciones cualitativamente diferentes con una sola planta hospedante o incluso interactúan entre sí, es difícil determinar

con precisión el impacto de cada interacción (Krings *et al.*, 2007). Además, Taylor *et al.*, (2004) destacan la existencia de varios tipos de respuestas específicas de la planta hospedante a la infección por hongos, que indicarían la existencia de métodos de defensa similares y, quizás, análogos a los de las plantas existentes. Esto sugiere que los mecanismos vinculados con el establecimiento y el mantenimiento de las asociaciones de las plantas terrestres con hongos ya existían antes del Devónico Inferior y que éstas pueden compararse con las de los ecosistemas modernos. Se ha postulado que, desde entonces, la existencia de diversas asociaciones y/o interacciones entre diversos organismos, no sólo entre plantas y hongos, sino también entre distintos grupos de hongos al colonizar una misma planta hospedante, han sido de fundamental importancia, sobre todo, en la colonización del ambiente terrestre (Krings *et al.*, 2007).

Actualmente, está ampliamente aceptado que la mayoría de las plantas albergan dentro de sus tejidos diversas comunidades de hongos que colonizan sus órganos sin causar ninguna enfermedad ni síntomas negativos evidentes. El término “endofito” es una definición funcional que se refiere a microorganismos, hongos o bacterias, que colonizan tejido vegetal sano, ya sea inter y/o intracelularmente, en cualquier órgano de la planta, y persisten todo, o parte del ciclo de vida en ella, sin causarle síntomas de enfermedad (Petrini, 1991; Schulz y Boyle, 2005; Hardoim *et al.*, 2015). El hecho de que los hongos endofitos hayan estado en asociación con las plantas por más de 400 millones de años se ha interpretado como un aspecto crucial para la supervivencia de ambos organismos y la función que desempeñan en los ecosistemas (Mandyam y Jumpponen, 2015). Los beneficios que confieren los hongos que expresan estilos de vida mutualistas incluyen tolerancia al estrés biótico y abiótico, mejora del crecimiento y mayor éxito reproductivo (Rodríguez y Readman, 2008). El análisis de las asociaciones entre plantas y endofitos en hábitats de alto estrés reveló que al menos algunos hongos endofitos confieren tolerancia al estrés específico del hábitat a las plantas hospedantes (Rodríguez *et al.*, 2009). Algunos autores, más radicales, consideran que, sin los hongos endofitos adaptados al hábitat, las plantas no podrían sobrevivir en sus hábitats nativos, incluyendo tanto a monocotiledóneas como a eudicotiledóneas (Rodríguez y Readman, 2008).

Según Rodríguez *et al.*, (2009), todas las plantas pueden establecer interacciones con endofitos, los cuales se clasifican en dos grandes grupos: clavicipitáceos y no clavicipitáceos y comprenden cuatro clases, que se diferencian en uno o varios de los siguientes aspectos: el patrón de colonización, el mecanismo de transmisión entre plantas, el grado de biodiversidad, la especificidad del tejido colonizado y los roles ecológicos adoptados por los endofitos (**Tabla 1**). En esta Tesis nos centraremos en dos de estas clases de endofitos.

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

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

Endofitos de vástago *Epichloë*

Las gramíneas invernales (C3) (Poaceae, subfamilia Pooideae) establecen simbiosis con endofitos fúngicos del género *Epichloë* (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae) (Leuchtmann *et al.*, 2014), los cuales colonizan de manera sistémica los espacios intercelulares (el apoplasto) de los tejidos aéreos de la planta (**Fig. 1**). Estos organismos forman un grupo particular de endofitos, comúnmente conocido como endofitos clavicipitáceos (Hypocreales, Ascomycota) y conforman la clase 1 de acuerdo a Rodríguez *et al.* (2009).

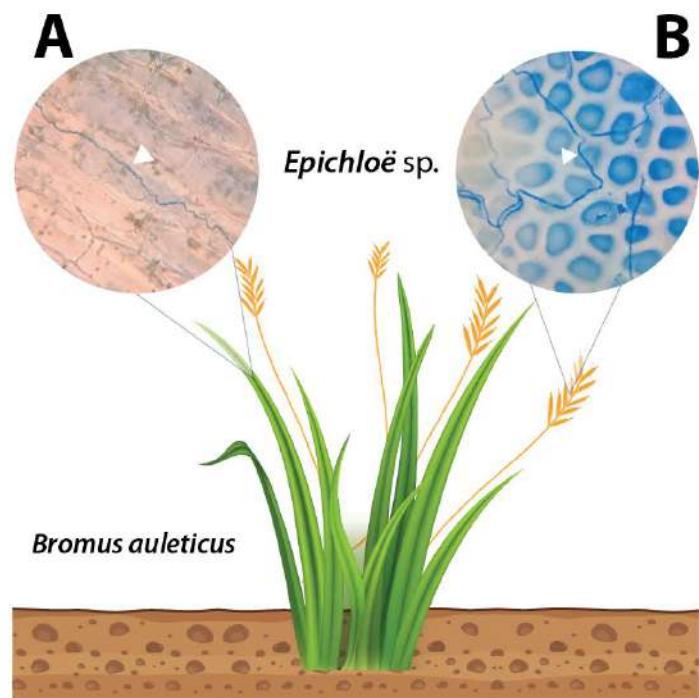


Fig. 1. Esquema de *Bromus auleticus* asociado a *Epichloë* **A.** presencia de hifas en vástago y **B.** hifas en semilla. En ambos casos teñidas con azul de anilina para facilitar su observación al microscopio óptico A: 400X.

Ciclo de Vida

Las especies de *Epichloë* difieren en sus ciclos de vida y estrategias reproductivas, lo que determina los mecanismos mediante los cuales estos endofitos colonizan nuevas plantas. Estas diferencias se hacen evidentes cuando las plantas hospedantes entran en la fase reproductiva. En aquellas especies del género que presentan fase sexual, las hifas crecen profusa y epifíticamente produciendo un estroma junto a células conidiógenas y conidios sobre el filoplano de cañas reproductivas. El desarrollo del estroma detiene la expansión de la hoja bandera, evitando la emergencia de la inflorescencia y causando esterilidad parcial o total en las plantas hospedantes. Los conidios formados sobre el estroma, que pueden actuar como espermacios, son transportados por las moscas hembras del género *Botanophila* (Anthomyiidae, Diptera) que se alimentan, depositan huevos y defecan en el estroma, diseminando los conidios de un estroma a otro. Las babosas que se alimentan del estroma y las ascosporas también son mecanismos para transferir los espermacios entre estromas (Alderman y Rao, 2008; Hoffman y Rao, 2014). Cuando

los conidios se depositan en un estroma del grupo de compatibilidad sexual opuesto (mating- type), se produce la fertilización y se forman peritecios. Las ascosporas son expulsadas con fuerza, y cuando llegan a una planta hospedante, la espora germina y coloniza una nueva planta sana, dando lugar a la transmisión horizontal (Schardl *et al.*, 2004) (**Fig. 2**). Por otro lado, en aquellas especies que sólo presentan fase asexual, las hifas pasan de la planta madre a las semillas colonizando el ovario de las flores en desarrollo y permaneciendo en la semilla, asociados al embrión, a la capa de aleurona o las cubiertas (Liu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Después de la germinación, el micelio endofítico se desarrolla en los tejidos foliares de plántulas jóvenes. De esta manera, los endofitos de especies que sólo presentan fase asexual se transmiten verticalmente a la siguiente generación a través de las semillas, en lo que se conoce como transmisión vertical (Schardl *et al.*, 2004).

Si bien el ciclo de vida consta de un estadio sexual y asexual, en América del sur, solo se han encontrado especies de *Epichloë* con transmisión vertical (Iannone *et al.*, 2012; Mc Cargo *et al.*, 2014).

Durante las fases vegetativas del hospedante, los endofitos *Epichloë* crecen intercelular y asintomáticamente en los tejidos del vástago. En el apoplasto el hongo obtiene azúcares simples y aminoácidos para su nutrición (Kulda y Bacon, 2008). Las hifas colonizan los meristemas apicales y crecen fuertemente adheridas a las paredes celulares de la planta hospedante (Christensen *et al.*, 2008). El crecimiento en los meristemas proporciona acceso a las zonas de elongación de nuevas hojas y yemas laterales que originarán nuevos macollos o cañas reproductivas. A medida que las células vegetales se agrandan, las hifas se estiran y crecen intercaladas. Como resultado, el endofito crece coordinadamente con el hospedante sin provocar una respuesta defensiva de la planta. En los tejidos parenquimáticos, las hifas no están ramificadas y se orientan paralelamente a los ejes longitudinales de las células del hospedador (Iannone *et al.*, 2021).

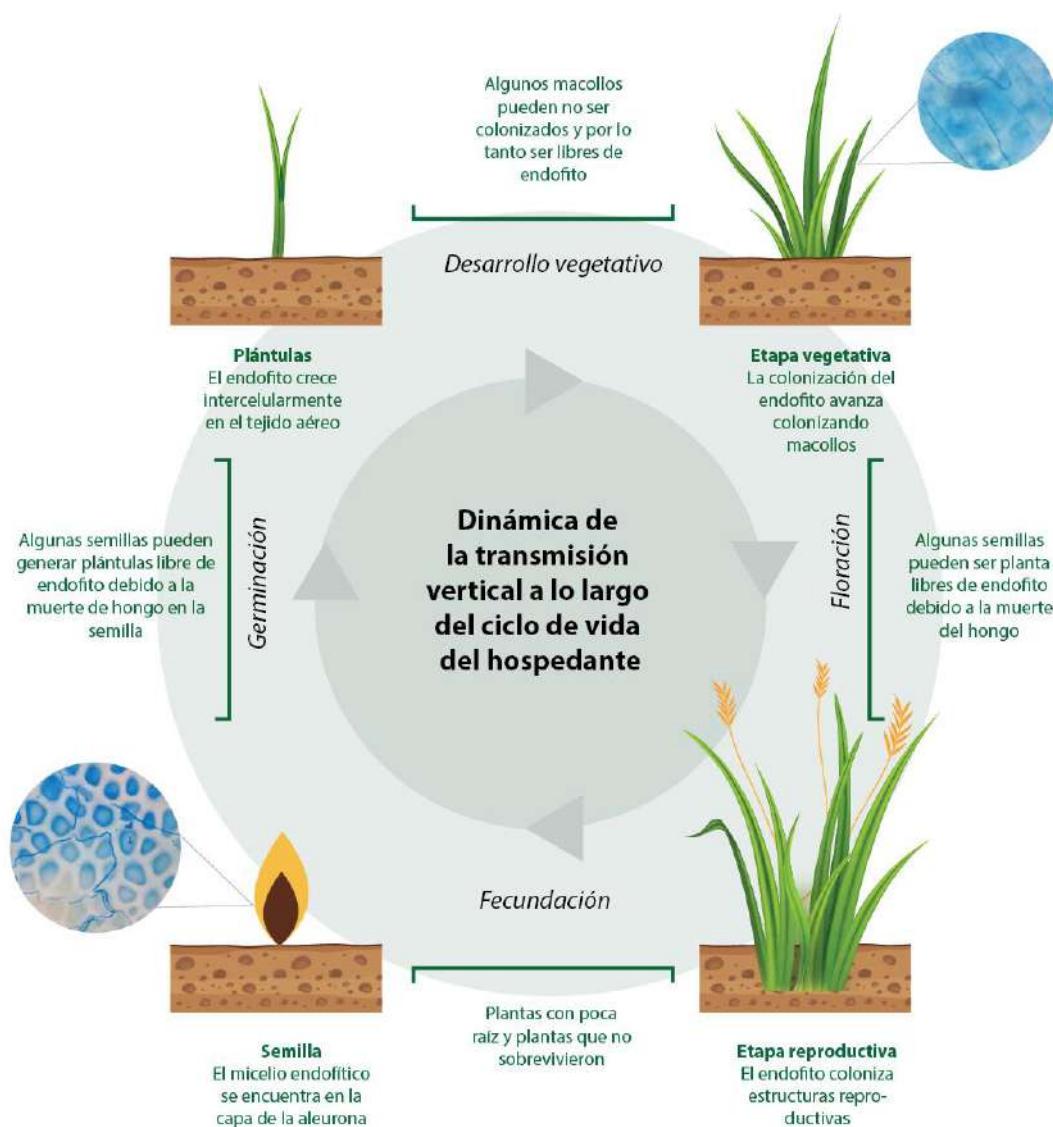


Fig 2. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. Transmisión vertical. Modificado de Iannone *et al.*, 2021

Distribución

La mayoría de los estudios realizados sobre los endofitos *Epichloë* se han llevado a cabo en Europa y América del Norte, seguidos en volumen por los estudios realizados en Asia, mientras que en África y América del Sur los estudios han sido escasos, centrándose en Argentina y Uruguay (Leuchtmann, 1992; Saikkonen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2006; Rudgers *et al.*, 2009; Zhan *et al.*, 2009; Semmarin *et al.*, 2015; McGranahan *et al.*, 2015; Iannone *et al.*, 2021).

El descubrimiento de gramíneas infectadas por endofitos en América del Sur se remonta a principios del siglo XX, cuando Rivas y Zanolli estudiaron el síndrome de la “tembladera” una intoxicación del ganado doméstico que pastaba la gramínea *Festuca febrigii* en el norte de Argentina. Descubrieron un hongo que crecía y producía conidios en el interior de las plantas (por tanto, un endofito). Asociaron la presencia de este hongo con la toxicidad de la planta y lo denominaron *Endoconidium tembladerae* (Rivas y Zanolli, 1908). Lamentablemente, el descubrimiento permaneció prácticamente ignorado hasta principios de los años noventa, cuando el Dr. D. Cabral y sus colaboradores iniciaron un estudio sistemático de los hongos endofitos de las gramíneas en Argentina (Iannone *et al.*, 2021). Las gramíneas de la subfamilia Pooideae están muy extendidas en Sudamérica, con más de 900 especies desde Venezuela hasta Tierra del Fuego. En las regiones tropicales de Venezuela a Bolivia, es frecuente encontrarlas a gran altitud (más de 2500 m s.n.m.) a lo largo de la Cordillera de los Andes. En el Cono Sur de Sudamérica, incluyendo Argentina, Uruguay, el sur de Brasil, Paraguay y Chile, “Pooideae” es la subfamilia dominante de las Poaceae y han sido reconocidas hasta 691 especies de gramíneas de estación fría (Biganzoli y Zuloaga, 2015). En esta parte del subcontinente, las Pooideae se extienden desde el Atlántico hasta el Pacífico (Iannone *et al.*, 2021) (**Fig. 3**).

En Argentina, se han registrado al menos 38 especies de gramíneas nativas asociadas a *Epichloë* (E+). Las especies de gramíneas han sido identificadas dentro de los géneros: *Briza*, *Bromus*, *Festuca*, *Melica*, *Phelum* y *Poa* (Iannone *et al.*, 2011), siendo las especies más recientemente detectadas *Hordeum comosum* (Gundel *et al.*, 2010) y *Poa calchaquensis* (Iannone *et al.*, 2012).

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

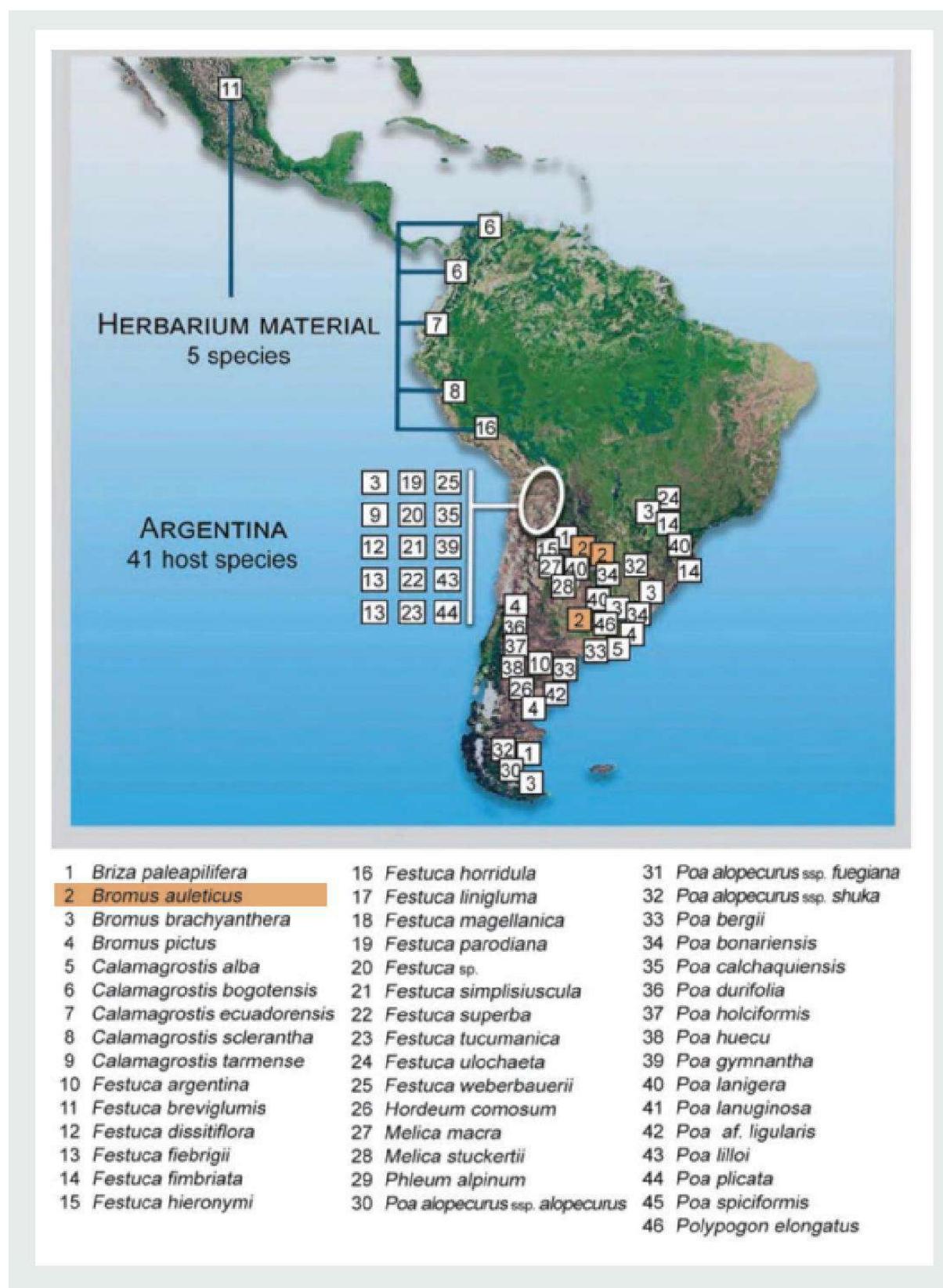


Fig. 3. Distribución de las especies de la subfamilia Pooidea en Sudamérica, Resaltado la distribución de *Bromus auleticus*. Modificado de Iannone et al., (2021)

Asociación gramínea-*Epichloë*

La asociación gramínea-*Epichloë* suele considerarse como una simbiosis mutualista. En esta interacción los endofitos obtienen beneficios como la dispersión, protección del medio ambiente y suministro de hidratos de carbono, mientras que las plantas hospedantes adquieren mayor capacidad competitiva ante condiciones de estrés biótico y abiótico. Una de las principales contribuciones a esta simbiosis es que algunas especies de *Epichloë*, al igual que lo que ocurre con otros miembros pertenecientes a la familia Clavicipitaceae, pueden producir alcaloides del ergot, tales como ergovalina y ergotamina, y/o indol-diterpenos como lolitrem B, los cuales poseen efectos neurotóxicos en mamíferos (Gallagher *et al.*, 1981; Panaccione, 2005). Además, muchos representantes de este género pueden producir lolinas (aminopirrolzidinas) y peramina (pirrolpirazinas) con efectos neurotóxicos, o bien que alteran la alimentación de insectos fitófagos y, posiblemente, otros invertebrados como los nemátodos (Tanaka *et al.*, 2005; Schardl *et al.*, 2007; Bacetti *et al.*, 2009). Además, de aumentar la resistencia a la herbivoría, estos endofitos pueden incrementar la tolerancia al estrés hídrico, pH bajo y baja disponibilidad de minerales (Malinowsky y Belesky, 2006; Belesky y West, 2009; Young *et al.*, 2015), así como potenciar el crecimiento vegetativo de la planta hospedante, la producción de semillas y la emergencia de plántulas (Novas *et al.*, 2003; Iannone y Cabral, 2006; Gundel *et al.*, 2011).

Además de los efectos directos observados en la planta hospedante, la asociación gramínea-*Epichloë* también puede afectar a los parámetros del suelo y a las comunidades de microorganismos asociadas o en cercanía a la planta. Aunque aún no se han esclarecido todos los mecanismos involucrados en estos procesos, uno de los más aceptados sería a través de los exudados radicales (Antunes *et al.*, 2008). Se ha demostrado que los metabolitos fúngicos, así como los producidos en el interior de la planta como consecuencia de la asociación, y exudados a través de las raíces al suelo rizosférico (Huang *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015), afectan a la microfauna y a las comunidades de microorganismos del suelo (Omacini *et al.*, 2004; Arrieta *et al.*, 2015).

Efecto de *Epichloë* sobre gramíneas nativas

Si bien se han identificado numerosas gramíneas asociadas a *Epichloë* en América del Sur, los estudios realizados para establecer el papel de los endofitos en la asociación siguen siendo escasos y se limitan únicamente a dos especies nativas, *Bromus pictus* y *Bromus auleticus*. Entre los parámetros analizados se puede mencionar el peso de las semillas, el cual ha mostrado diferentes tendencias según la gramínea evaluada. En *B. auleticus*, el menor peso de las semillas de las poblaciones E+ podría ser ventajoso para su dispersión sin afectar la supervivencia de plántulas en la Pampa, una región húmeda con vientos suaves y suelos ricos en nutrientes (Iannone y Cabral, 2006). Mientras tanto, en la Patagonia, el mayor peso de las semillas de las poblaciones E+ de *B. pictus* podría representar una ventaja para las plantas E+, ya que semillas con mayor contenido de reservas podría resultar en una mejor supervivencia de plántulas en suelos pobres en nutrientes y condiciones de estrés por sequía de la Patagonia, mientras que su dispersión no se vería afectada por su peso debido al fuerte viento característico de esta región (Novas *et al.*, 2003). En el mismo estudio, en condiciones de invernadero, plantas E+ de *B. pictus* presentaron parámetros de crecimiento y emergencia, peso seco y longitud foliar más elevados y una mortalidad más baja en comparación con aquellas libres de *Epichloë* (E-), lo que sugiere una ventaja adaptativa de las plantas en simbiosis, al menos en lo que respecta al desarrollo vegetativo. Por otra parte, experimentos en invernadero y en campo indicaron que las plantas E+ de *B. auleticus* producen más biomasa y semillas y son más resistentes a la defoliación continua que las plantas E- (Iannone y Cabral, 2006; Iannone *et al.*, 2012). Además, en ensayos de micropropagación *in vitro*; las semillas infectadas con endofitos *Epichloë* presentaron una mayor inducción de callos, regeneración de plantas a partir de callos y biomasa de plántulas regeneradas (Regalado *et al.*, 2018).

Por otra parte, la asociación con *Epichloë* también puede conferir resistencia contra hongos patógenos. Plantas de *B. auleticus* asociadas con *E. pampeana* y *Epichloë* sp. presentaron resistencia contra la enfermedad del carbón causada por *Ustilago bullata* Berk. (Vignale *et al.*, 2013; Iannone *et al.*, 2017).

Endofitos de raíz: hongos DSE

Generalidades

Entre los hongos endofitos, se encuentran aquellos conocidos como endofitos septados oscuros, o simplemente hongos DSE por sus siglas en inglés (Dark septate endophytes). En comparación con las simbiosis micorrícica o los endofitos foliares sistémicos transmitidos verticalmente, los hongos endofitos asociados a las raíces, particularmente los DSE, han recibido muy poca atención (Rodríguez *et al.*, 2009).

De acuerdo con la clasificación de Rodríguez *et al.* (2009) mencionada anteriormente (**Tabla 1**), los hongos DSE se encuentran entre los endofitos no clavicipítáceos pertenecientes a la clase 4. Según esta clasificación se trata de endofitos con amplio rango de hospedantes, colonización sistémica que se limita a las raíces y que presentan transmisión horizontal fundamentalmente a través de micelio y pocas veces, mediante conidios. Un poco más controversial es el hecho de que, en esta clasificación, se les atribuyen efectos beneficios no relacionados con una adaptación al hábitat (Rodríguez *et al.*, 2009).

Estructuras características

Si bien en un principio simplemente se los agrupaba debido a su capacidad para formar hifas septadas y oscuras en las raíces, es decir, debido a caracteres fenotípicos, en los últimos años se ha avanzado en la identificación de los géneros y especies que comprende este tipo de endofitos. Esto ha permitido establecer que aunque se trata de un grupo altamente heterogéneo formado por géneros pertenecientes a diferentes familias y órdenes dentro del Phylum Ascomycota. Se caracterizan por colonizar las raíces de las plantas tanto inter como intracelularmente y formar tanto clamidosporas como microesclerocios, los que son considerados estructuras de resistencia. Aunque la presencia de melanina en las estructuras vegetativas y reproductivas es una característica típica de estos hongos, se ha visto que pueden presentar estructuras hialinas asociadas a estructuras melanizadas (Barrow y Aaltonen, 2001; Barrow 2003; Barrow y Aaltonen, 2004; Zhang *et al.*, 2010). Las melaninas son una familia de compuestos que se encuentran en animales, plantas, bacterias y hongos (Butler y Day, 1998). Las

melaninas de los hongos están presentes en las paredes celulares de hifas, las esporas y otras estructuras, asociadas con proteínas o carbohidratos, o pueden liberarse en la fracción extracelular (Gessler *et al.*, 2014). Se trata de biopolímeros sintetizados a partir de compuestos fenólicos o indólicos. Si bien no son esenciales en las vías metabólicas primarias, pueden cumplir funciones de supervivencia esenciales, particularmente en condiciones ambientales hostiles (Butler y Day, 1998; Gessler *et al.*, 2014), por ejemplo proteger a las hifas de la desecación y la alteración mecánica, mejorando la rigidez de la pared celular, la hidrofobicidad y disminuyendo su permeabilidad (Potisek *et al.*, 2021). La naturaleza y el contenido de melanina varían drásticamente entre los hongos. Se han descrito varias clases de melaninas en función de los precursores bioquímicos, las vías de síntesis y los componentes que participan: la γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenceno (GDHB)-melanina; L-DOPA-melanina, conocida como eumelanina, DHN-melanina, catecol-melanina, piromelanina y p-aminofenol (PAP)-melanina. La síntesis y deposición de las melaninas varían según el taxón, el estado metabólico del hongo y las condiciones del medio ambiente o condiciones de cultivo (Toledo *et al.*, 2017). Varios autores suponen que su filogenia regiría en gran medida el tipo de melanina producida por los hongos (Berthelot *et al.*, 2020). Por ejemplo, los miembros del Phylum Basidiomycota producen melaninas GDHB, catecol y DOPA-melaninas, mientras que los del Phylum Ascomycota producen melanina DHN, piromelanina y, a veces, DOPA-melaninas (Wheeler 1983; Gessler *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2017). Sin embargo, se han observado algunas excepciones por lo que el conocimiento sobre las vías de biosíntesis de melaninas en hongos necesita una investigación más detallada (Gonçalves *et al.*, 2012). Los estudios acerca de la naturaleza de las melaninas en hongos DSE ha sido limitada (Zhan *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2016; Knapp *et al.*, 2018). Entre las cepas de hongos DSE en las que las rutas de biosíntesis se han investigado, se comprobó que la mayoría sintetizan DHN-melanina, pero algunas también pueden sintetizar otros tipos de melanina, como DOPA-melanina, piromelanina y melaninas heterogéneas (López *et al.*, 2024). Aunque se ha propuesto, con bastante aceptación que las melaninas brindan tolerancia en hongos DSE por sus características antioxidantes y termoprotectoras (Nuñez *et al.*, 2022), aún no se conocen la naturaleza química y la función de muchos de los pigmentos oscuros sintetizados por estos hongos (López *et al.*,

2024). Claramente, se necesitan más investigaciones para dilucidar su contribución a la tolerancia al estrés y, particularmente, su impacto en la interacción de los hongos DSE con diversas plantas de importancia agroforestal (López *et al.*, 2024).

Primeras observaciones

La presencia de hongos similares a los DSE fue documentada por primera vez por Gallaud (1905), quien informó sobre un tipo de colonización atípica por endofitos septados en raíces de *Allium sphaerocephalum* L. y *Ruscus aculeatus* L. Sin embargo, fue Melin (1922) quien realizó las primeras descripciones de estos endofitos como grupo e introdujo la forma taxón *Mycelium radicis atrovirens* (MRA) para micelios septados, melanizados y estériles asociados a ectomicorras y raíces de *Picea abies* y *Pinus sylvestris*. Posteriormente Melin (1923) acuñó el término “pseudomicorriza” para esta relación y la consideró como una simbiosis de tipo antagónica. Uno de los trabajos más amplios es el de Peyronel, quien en 1924 registró la colonización por endofitos septados en más de 135 especies de angiospermas. Estos trabajos pioneros en el grupo dan cuenta de la dificultad de catalogar el rol funcional de estos endofitos y por ende, de asignarles una clasificación adecuada. Desde esos primeros trabajos, muchos otros describieron este tipo de hongos en diversos ambientes, utilizando diferentes denominaciones (Richard y Fortin, 1973; Read y Haselwandter, 1981). A pesar de que constituyen un agrupamiento heterogéneo de hongos, fue recién en 1991 cuando Stoyke y Currah introdujeron la denominación actual “endofito septado oscuro” (DSE), utilizada para describir hongos con hifas septadas y parcial o totalmente melanizados dentro de tejidos radicales sanos. Muchos de los trabajos realizados en las siguientes décadas se centraron en describir la colonización en plantas de ambientes extremos, ya que en la mayoría de los casos estos hongos fueron encontrados durante el análisis de la colonización de otros simbiontes, como las ectomicorras y las micorras arbusculares (Jumpponen y Trappe, 1998) en esos ambientes. Este aspecto es el que llevó a muchos investigadores a hipotetizar que la presencia de melaninas en las estructuras de estos hongos jugaría un papel importante en la tolerancia a tales condiciones e incluso han especulado acerca de un papel en la tolerancia de los hospedantes. Sin embargo, trabajos posteriores han establecido su presencia su presencia en otros ambientes (Mandyam y Jumpponen, 2015).

Distribución

Estos endofitos han sido encontrados en un amplio rango geográfico, desde las llanuras costeras de Sudáfrica hasta las zonas tropicales, templadas, subalpinas, alpinas y marítimas y también en zonas antárticas y árticas. Son especialmente frecuentes en ecosistemas asociados con alguna condición de estrés tales como ecosistemas árticos o de gran altitud (Newsham, 2011), áridos o semiáridos (Knapp *et al.*, 2012), sequía, alto contenido de sal, baja fertilidad, alta concentración de CO₂ o incluso en suelos contaminados con metales pesados (Ban *et al.*, 2012). Este aspecto es el que ha motivado a muchos investigadores a proponer que la interacción entre los hongos DSE y las plantas hospedantes es crucial para la supervivencia de estas últimas en condiciones de estrés (Knapp *et al.*, 2015). La tolerancia de estos hongos a las condiciones adversas ha sido atribuida por Barrow (2003) a la presencia de melaninas en la superficie de las hifas y los microesclerocios. En algunos trabajos se ha podido correlacionar su presencia con una mayor tolerancia a la presencia de compuestos tóxicos (Zhan *et al.*, 2016; Potisek *et al.*, 2021). Sin embargo, esta correlación no siempre se ha podido comprobar (Frederick *et al.*, 1999). De hecho, en un estudio con diferentes especies de hongos DSE expuestas a concentraciones crecientes de sal, la tolerancia no se correlacionó con la acumulación de melaninas (Graber *et al.*, 2020). En cuanto al efecto sobre los hospedantes colonizados por hongos DSE, la hipótesis general sugerida por muchos estudios es que la alta concentración de este pigmento protege a las plantas de los radicales libres o iones de metales pesados debido a su efecto antioxidante (Zhan *et al.*, 2011; Ban *et al.*, 2012). Aunque en un trabajo reciente Graber *et al.*, (2023) establecieron que la presencia de melanina en diferentes cepas de hongos DSE jugó un papel importante en el proceso de colonización de plantas de tomate, sin ejercer influencia en el crecimiento, la absorción de nutrientes o la tolerancia de las plantas a altas concentraciones de sal. La caracterización y el papel de las melaninas en la respuesta de estos hongos y en particular en su papel en los hospedantes ante condiciones adversas, es un aspecto que aún necesita ser investigado en profundidad.

En cuanto a la distribución de los hongos DSE en Argentina, existen pocos trabajos que analicen la composición y diversidad de la comunidad de hongos DSE en

ambientes agrícolas o naturales. La mayoría de los trabajos describen la colonización de las raíces por estos hongos, sin realizar ningún tipo de identificación ni aislamientos. Si bien en un comienzo se documentó la presencia de estos endofitos cuando se hacían registros de la colonización de hongos MA (Urcelay 2002; Lugo *et al.*, 2009; Lugo *et al.*, 2011), paulatinamente se incrementaron los trabajos en los que los objetivos se centraban en el análisis de la colonización de ambos tipos de hongos o específicamente sólo de hongos DSE, en distintos géneros de plantas vasculares presentes en distintas regiones naturales del país. Se ha descripto la colonización en más de 48 familias de plantas de diversos hábitats. Entre ellos pueden mencionarse trabajos realizados en las provincias de Córdoba (Menoyo *et al.*, 2007; Fracchia *et al.*, 2009), Tucumán (Albornoz *et al.*, 2014; Lizarraga *et al.*, 2015), Entre Ríos (Terlizzi *et al.*, 2022), Buenos Aires (Rothen *et al.*, 2017), sitios salinos de Salta y Jujuy (Cofré *et al.*, 2012), la región de la Puna (Lugo *et al.*, 2018; Menoyo *et al.*, 2020) y bosques patagónicos (Fernández *et al.*, 2008; 2010; Salgado Salomón *et al.*, 2013). Se han observado en muchos de estos estudios que los hongos DSE coexisten en las raíces de las plantas con los hongos micorrílicos arbusculares (HMA) (Becerra *et al.*, 2009; Lugo *et al.*, 2009; Fracchia *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2011; Cofré *et al.*, 2012; Salgado Salomón *et al.*, 2013; Mercado *et al.*, 2013; Lizarraga *et al.*, 2018; Lugo *et al.*, 2018; Menoyo *et al.*, 2020; Terlizzi *et al.*, 2022; Cuassolo y Villanueva, 2023). En efecto, los endofitos septados oscuros coexisten con las micorrizas, independientemente del estado de las micorrizas o las características ambientales, por lo que se ha sugerido que es necesario profundizar los patrones de diversidad global y sus factores determinantes (Fontenla *et al.*, 2022).

Reproducción

De muchos de los hongos DSE, no se conocen sus estructuras reproductivas sexuales ni asexuales, lo que ha dificultado su identificación mediante caracteres morfológicos. Los miembros del Complejo *Phialocephala fortinii-Acephala applanata* (PAC), unos de los grupos de endofitos septados oscuros predominantes en las raíces de las plantas leñosas en muchos ecosistemas del hemisferio norte, han sido ampliamente estudiados (Sieber y Grünig, 2006; Grünig *et al.*, 2008; Zeilinger *et al.*, 2016). Sin embargo, poco se sabe sobre su biología reproductiva y cómo contribuye

a su papel ecológico en los ecosistemas forestales. Los estudios de Zaffarano *et al.*, (2011) sugirieron la posibilidad de existencia de sexo críptico en el PAC. En un relevamiento de endofitos foliares de diferentes especies de *Picea* y de *Pinus*, Tanney *et al.*, (2016) encontraron que *Phialocephala* spp. fue uno de los aislamientos más frecuentes y también pudieron recolectar los estados sexuales correspondientes a *P. scopiformis*, *P. piceae* y a varias especies no descritas.

Como endofitos de transmisión horizontal, los hongos DSE se propagan fundamentalmente a través de las estructuras vegetativas que forman al asociarse con sus hospedantes. Los microesclerocios, además de constituir estructuras de almacenamiento y de resistencia, junto con las hifas asociadas o colonizando trozos de raíces en descomposición y eventualmente, cuando los originan, los conidios, constituyen las principales formas de propagación (Mandyam y Jumpponen, 2015; Young *et al.*, 2021).

Colonización del hospedante

La colonización de las raíces por hongos DSE no siempre ha sido exhaustivamente descripta. Existen pocos trabajos que analicen los primeros eventos y el patrón de colonización. Se considera que la colonización de las raíces por hongos DSE en general sigue un patrón similar y comienza con el desarrollo de un cierto número de hifas superficiales, formación de coils sobre pelos radiculares y/o sobre otras células epidérmicas (O'Dell *et al.*, 1993; Stoyke y Currah, 1993; Yu *et al.*, 2001; Ohki *et al.*, 2002). En ciertos casos pueden verse estructuras semejantes a hifopodios (Currah *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2001) y sólo ocasionalmente, pueden aparecer estructuras semejantes a una red de Hartig o un manto en ciertas plantas leñosas (O'Dell *et al.*, 1993; Fernando y Currah, 1996). Otros ejemplos de observación de estructuras atípicas son los casos de *Acephala macrosclerotiorum* originando estructuras que se asemejan a ectomicorizas en pinos y abetos (Lukešová *et al.*, 2015) o *Heteroconium chaetospira* formando loops semejantes a micorizas ericoides en *Rhododendron obtusum* var. *kaempferi* (Usuki y Narisawa, 2005). Las hifas penetran los espacios entre las células epidérmicas adyacentes, continúan hasta el eje principal de la raíz y pasan a través de los espacios intercelulares de las células corticales. Una vez que las hifas están dentro de la raíz, forman masas de células fúngicas melanizadas empaquetadas dentro de las células corticales, lo que resulta

en el desarrollo de microesclerocios sin colonización del tejido vascular (Ohki *et al.*, 2002; Yonezawa *et al.*, 2004; Shadmani *et al.*, 2021). Los microesclerocios han mostrado acumulación de glucógeno, proteínas y polifosfatos (Yu *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2021), los que estarían implicados en incrementos de la viabilidad fúngica en condiciones adversas (Yung *et al.*, 2021) (**Fig 4**).

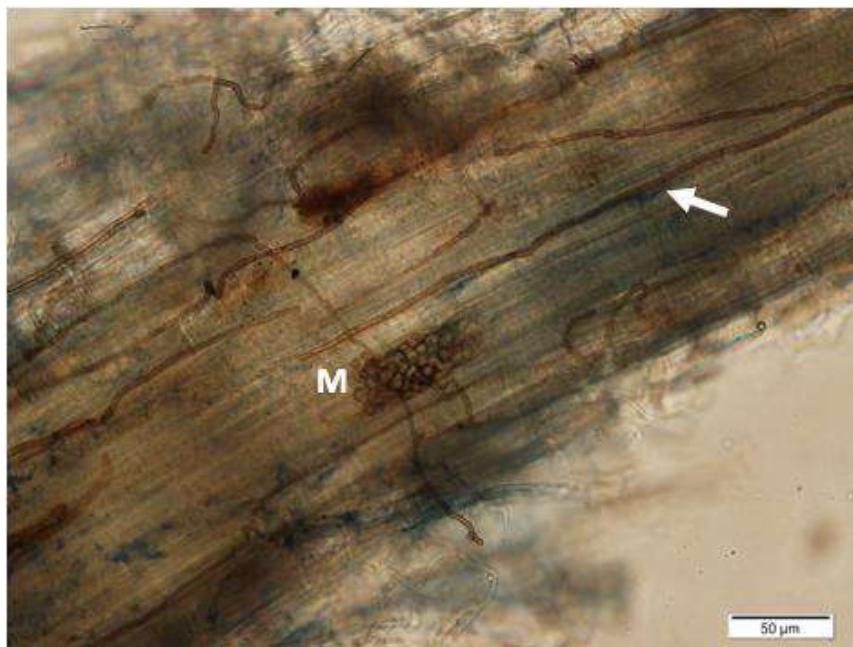


Fig 4. Estructuras características de los DSE. Hifas septadas oscuras (flechas) y microesclerocios (M) en raíz de *Bromus auleticus*. A: 400X

Efectos sobre el hospedante: crecimiento y nutrición

Debido a su alta diversidad funcional y de especies, no es fácil sacar conclusiones y hacer afirmaciones generales sobre los DSE y sobre la naturaleza de las asociaciones planta-DSE (Newsham, 2011; Mayerhofer *et al.*, 2013). Algunos autores sostienen que, al igual que los hongos micorrílicos, los DSE pueden formar una red de hifas que permiten ampliar la superficie de contacto con el suelo, así como alcanzar microporos a los que las raíces no pueden llegar. De este modo, les permite acceder al agua y a los nutrientes más allá de la zona de agotamiento (Liu y Wei, 2019). Uno de los trabajos más interesantes y precursores en el estudio del intercambio de nutrientes es el de Usuki y Narisawa (2007), quienes lograron comprobar que el hongo *Heteroconium chaetospira* transfirió nitrógeno (N) a plantas

de *Brassica campestris*, mientras que éstas le suministraron fuentes de Carbono (C), principalmente sacarosa. Upson *et al.*, (2009) al evaluar los efectos de seis DSE miembros de Helotiales (*Oculimacula yallundae*, *Mollisia* y *Tapesia* spp.) sobre el crecimiento y el equilibrio de nutrientes de *Deschampsia antártica*, en presencia de diferentes fuentes orgánicas e inorgánicas de N, encontraron diferencias significativas. Al emplear fuentes inorgánicas no se observaron efectos o se observaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las plantas, mientras que en presencia de formas orgánicas se observó inducción del crecimiento. En este último caso, además, la mitad de las cepas aumentaron el contenido de nitrógeno, por lo que sugirieron que los DSE son capaces de mineralizar péptidos y aminoácidos en la rizosfera, haciendo que el N esté más disponible para las raíces. Por su parte, Alberton *et al.*, (2010), al evaluar los efectos de diferentes DSE sobre el crecimiento y la adquisición de nutrientes en plántulas de *Pinus sylvestris* en condiciones limitadas de N y elevadas concentraciones de CO₂. En el ensayo de 125 días que llevaron a cabo, los últimos 27 días las plántulas se marcaron con ¹⁴CO₂ y ¹⁵NH₄⁺. Los resultados demostraron que los hongos DSE aumentaron la eficiencia del uso de nutrientes de la planta sobre todo en condiciones elevadas de CO₂. En efecto, las plantas inoculadas con los endofitos mostraron incrementos en la biomasa y la respiración subterránea. La concentración de N en los brotes disminuyó en condiciones elevadas de CO₂. Mahmoud y Narisawa (2013) encontraron que un DSE identificado como *Scolecobasidium humicola*, aumentó la biomasa en plantas de tomate en presencia de fuentes de nitrógeno orgánico.

Trabajos más recientes confirmaron la importancia de los hongos DSE como descomponedores de materia orgánica y facilitadores en la movilización de compuestos de fósforo y nitrógeno. Este es el caso de tres aislamientos *Phialocephala fortinii* obtenidos a partir de raíces de *Asparagus officinalis*, los que aumentaron el crecimiento de plantas al utilizar fuentes orgánicas de fósforo y nitrógeno y en medios orgánicos y semiorgánicos (Surono y Narisawa, 2017). Vergara *et al.*, (2017) también trabajaron con fuentes orgánicas e inorgánicas enriquecidas con ¹⁵N en tomate inoculadas o no con hongos DSE y determinaron que en los tratamientos con hongos DSE en presencia de la fuente orgánica mostraron una mayor eficiencia de recuperación ¹⁵N, P y K. Además, aumentaron los contenidos de ¹⁵N, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn y Zn, la altura de las plantas, el

número de hojas y otros parámetros de crecimiento. En contraste, los únicos efectos positivos observados en presencia de la fuente de N inorgánico fueron la eficiencia de recuperación de K, el contenido de K y el área foliar en presencia de una de las cepas de DSE. Al emplear las mismas cepas de DSE con el objetivo de evaluar su impacto en la actividad de las bombas de protones, la recuperación de nitrógeno a partir de una fuente inorgánica (sulfato de amonio) y la acumulación de nutrientes en plantas de arroz, Vergara *et al.*, (2019) comprobaron que una de las cepas endofíticas indujo la expresión de ciertas isoformas de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, la actividad de la H⁺-ATPasa de membrana y la H⁺-pirofosfatasa. Debido a estos resultados los investigadores postularon que estos efectos reflejan una estrategia para mejorar la recuperación de N del sulfato de amonio y el crecimiento de las plantas de arroz. Por el contrario, Yatki *et al.*, (2019) encontraron que al evaluar dos cepas de DSE de los géneros *Periconia* y *Cadophora*, sólo la primera de ellas aumentó la biomasa de plantas de tomate cuando estaban presentes fuentes orgánicas, pero ambas promovieron el crecimiento cuando se cultivaron con fertilizantes inorgánicos. Estos investigadores sugieren que la respuesta de crecimiento del tomate con fertilización inorgánica no se basaría en mejoras en la nutrición vegetal, lo que sí podría explicar los resultados en presencia de fuentes orgánicas con *Periconia*. Li *et al.*, (2023) pudieron establecer que la aplicación de hongos DSE identificados como *Acrocalymma aquatica* y *Alternaria alstroemeria* combinados con residuos orgánicos para el cultivo de la planta medicinal *Isatis indigotica* bajo estrés por sequía, mejoró el contenido del alcaloide epigoitrina, un compuesto con propiedades antivirales, y también la biomasa vegetal. En los ensayos que fueron realizados en maceta observaron además que la aplicación mixta de DSE y residuos orgánicos tuvo efectos sinérgicos adicionales sobre las actividades enzimáticas del suelo y la materia orgánica del suelo. En resumen, existen numerosos trabajos que registran la participación de varios hongos endofítos en la mejora del crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes sin embargo, pocos trabajos establecen cuáles son los mecanismos específicos por los que hongos endofítos modifican la fisiología de las plantas y ejercen sus efectos (Sarkar *et al.*, 2021) (**Fig 5**). Más allá de estos trabajos puntuales, se acepta que no hay evidencias claras de un intercambio directo de nutrientes entre una planta y los

DSE, ya que nunca se han detectado interfaces especializadas para la transferencia mutualista de nutrientes (Ruotsalainen *et al.*, 2022).

Los conocimientos recientes sobre la genética de los DSE revelaron que muchas cepas tienen una proporción notablemente alta de genes característicos de los hongos saprobios en sus genomas (Schlegel *et al.*, 2016; Knapp *et al.*, 2018). De hecho se ha comprobado que algunas cepas producen una amplia gama de enzimas hidrolíticas y oxidativas, incluyendo amilasas, celulasas, lacasas, lipasas, pectinasas, oxidases polifenólicas, enzimas proteolíticas y xilanases, y muestran una actividad lignolítica incompleta (Caldwell *et al.*, 2000; Vohník *et al.*, 2012; Surono y Narisawa, 2017). De este modo, uno de los principales mecanismos por los cuales benefician a su hospedante es mediante la mineralización de sustratos presentes en el suelo, favoreciendo la incorporación de nutrientes (Vohník *et al.*, 2012; Knapp *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2020; Ruotsalainen *et al.*, 2021). Algunos autores hipotetizan que los DSE requieren solo una inversión mínima de recursos de la planta a causa de su capacidad saprofítica por lo que podrían obtener C a partir de subproductos metabólicos de desechos de la planta (Ruotsalainen *et al.*, 2021). Entonces, aún queda por entender las razones de su colonización intrarradical e intracelular, lo que ha llevado a preguntarse si el tipo de colonización está relacionado con la búsqueda de un nicho seguro y estable o refugio dentro de las raíces frente a condiciones adversas presentes en el suelo (Ruotsalainen *et al.*, 2021).

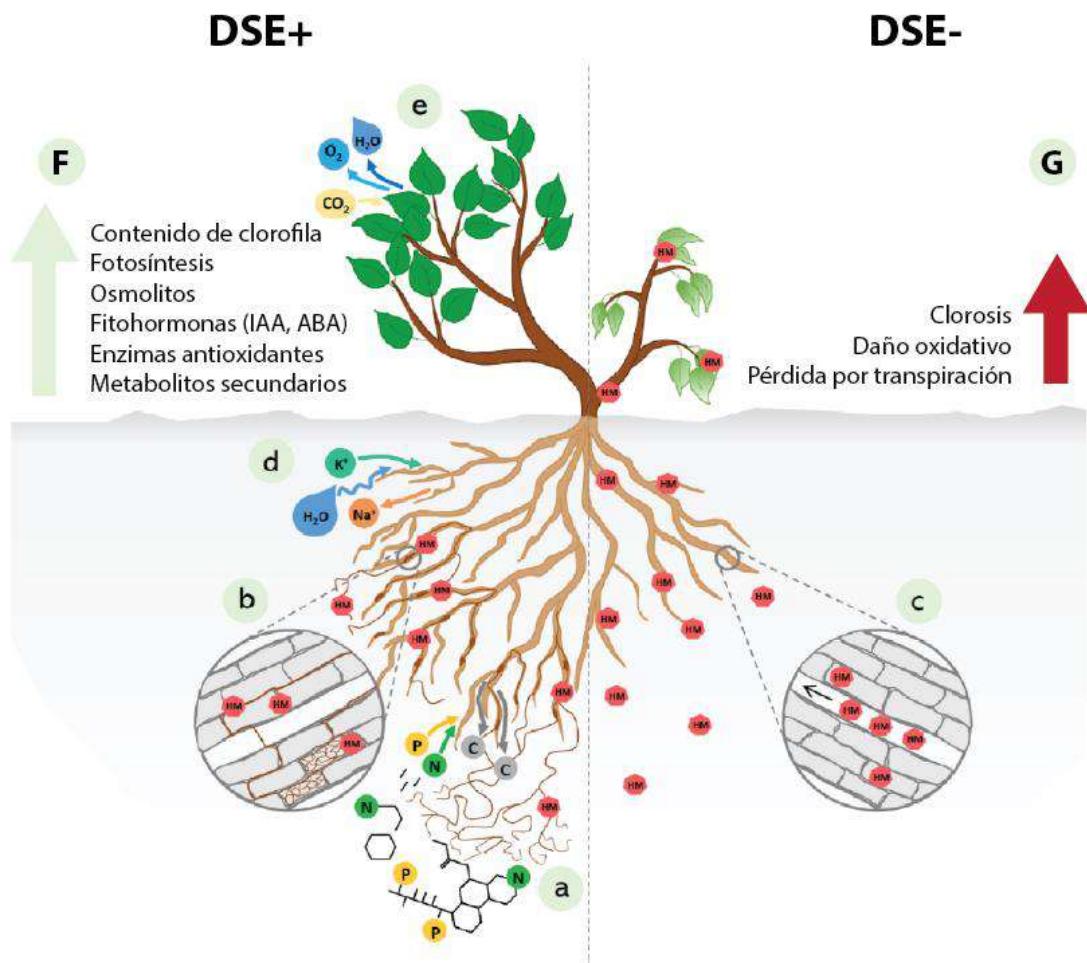


Fig 5. Los efectos de la colonización de DSE en la aptitud de las plantas afectadas por metales pesados y sequía. Las DSE favorecen el crecimiento de las plantas mejorando su nutrición. A cambio del carbono (C) derivado de las plantas, los DSE descomponen eficientemente el sustrato del suelo incrementando el conjunto de nutrientes (P y N) disponibles para las plantas (a). Los DSE protegen a las plantas de los metales pesados (HM), ya sea por su inmovilización directa por las hifas fúngicas o favoreciendo su secuestro en las paredes celulares de las plantas, reduciendo la reserva soluble de HM (b) y su posterior translocación al tejido vascular de las raíces y los brotes (c). Los DSE aumentan la tolerancia de las plantas a la sequía y la salinidad mejorando las propiedades hidráulicas de las raíces. Las plantas colonizadas por DSE producen raíces más largas de menor diámetro y mayor biomasa, caracterizadas por un intercambio iónico y una absorción de agua eficiente (d). Además, la presencia de DSE en plantas afectadas por la sequía mejora la conductancia estomática, el intercambio de gases y la transpiración (e). Las asociaciones mutuas entre las DSE y las plantas favorecen la fisiología vegetal, aumentando el contenido de clorofila, la tasa de fotosíntesis y la producción de fitohormonas, como la auxina (IAA) y el ácido abscísico (ABA), así como los mecanismos de defensa de las plantas, como la producción de osmolitos, enzimas antioxidantes y metabolitos secundarios (f). La exposición de plantas no colonizadas por el DSE a la sequía y al HM provoca su baja biomasa, clorosis, aumento del daño oxidativo y pérdida de transpiración (g). Modificado de Malicka *et al.*, (2022)

En Argentina, hay muy pocos trabajos que evalúen los efectos sobre los hospedantes, particularmente sobre su nutrición y crecimiento. Entre aquellos en los

que se observaron efectos beneficiosos para las plantas hospedantes, pueden mencionarse incrementos en la biomasa, en el número de frutos en plantas de soja y trigo al inocular una cepa nativa perteneciente al género *Drechslera* (Navarro, 2008). En ensayos realizados con una cepa de hongo DSE identificada como *Alternaria alternata*, seleccionada por su tolerancia al fungicida carbendazim, se realizaron ensayos en plantas de trigo con y sin la incorporación del fungicida, se encontraron aumentos en la biomasa de las plantas en presencia de la cepa en los tratamientos con el agroquímico (Cisneros *et al.*, 2014). En ensayos preliminares en plantas de soja con DSE provenientes de diferentes regiones y hospedantes, Lo *et al.*, (2014) hicieron un análisis fisiológico de tres cepas pertenecientes al orden Pleosporales y encontraron que dos de ellas fueron capaces de producir auxinas, ninguna solubilizó fosfatos, todas produjeron endo y exoglucanasas, sólo una ligninasas y ninguna produjo pectinasas. Al evaluar los efectos en plantas de soja, encontraron que las tres cepas produjeron aumentos en la longitud de los vástagos y en los pesos secos de vástagos y raíces, aunque las diferencias no fueron significativas. Posteriormente, Lo *et al.*, (2014) realizaron ensayos en plantas de trigo y de cebada, combinando una cepa de *Dreschlera* sp. con una de un hongo MA, *Rhizophagus intrarradices*, con cosechas en diferentes etapas fenológicas. En trigo, estos investigadores encontraron un adelantamiento en la espigazón en el tratamiento con el DSE, mientras que en las plantas inoculadas sólo con la cepa de hongo MA y con ambas cepas, mostraron incrementos en el número de espigas. Por último, Rothen (2015) al analizar el perfil enzimático de diversos DSE, encontró una relación entre las capacidades enzimáticas y el comportamiento en la planta hospedante, donde los endofitos estrictos fueron los que menos actividades enzimáticas presentaron. La producción de AIA fue variable. En ensayos de facilitación y translocación de N *in vitro*, *Cladosporium sphaerospermum*, favoreció el crecimiento de plantas de *Glycine max*. Los mismos resultados fueron obtenidos en condiciones de invernadero, cuando las plantas fueron co-inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno, las que además desarrollaron mayor cantidad de nódulos en presencia del DSE. Este hongo también promovió el crecimiento de *Triticum aestivum*. Estos resultados positivos se dieron particularmente en condiciones donde el nitrógeno no se encontraba asimilable.

Interacciones múltiples *Epichloë-Bromus auleticus*- DSE

Como se ha mencionado, las plantas están involucradas simultáneamente en múltiples interacciones con microorganismos (Larimer *et al.*, 2010). Sin embargo, la mayor parte de la investigación sobre las interacciones tripartitas en plantas se ha centrado en los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las bacterias fijadoras de nitrógeno (Afkhami *et al.*, 2020). Por lo tanto, es importante ampliar estos estudios más allá de las asociaciones de HMA, rizobios y leguminosas, mejorando así nuestro conocimiento sobre las interacciones múltiples.

Los HMA, clasificados en el Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), son simbiontes mutualistas obligados de la mayoría de las plantas. Mientras que la planta hospedante proporciona carbohidratos, el simbionte fúngico puede aumentar la absorción de nutrientes inorgánicos, especialmente fósforo y nitrógeno, así como el aumento de la resistencia frente a los patógenos de las plantas y la sequía (Smith y Read, 2008). Se han observado efectos positivos y negativos en la colonización de la raíz por HMA debido a la simbiosis con endofitos *Epichloë* (Chu-Chou *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1992; Müller, 2003; Novas *et al.*, 2005, 2009; Omacini *et al.*, 2006; Mack y Rudgers, 2008; Liu *et al.*, 2011; Arrieta *et al.*, 2015; Vignale *et al.*, 2016, 2018, 2020, 2023). Mientras que las investigaciones realizadas en gramíneas silvestres han mostrado un mayor grado de colonización de HMA en plantas asociadas a *Epichloë* (E+) que en plantas no asociadas (E-) (Novas *et al.*, 2005, 2009; Larimer *et al.*, 2012; Arrieta *et al.*, 2015; Vignale *et al.*, 2016, 2018, 2020), las investigaciones realizadas en gramíneas agronómicas seleccionadas mostraron resultados opuestos (Chu-Chou *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1992; Müller, 2003; Omacini *et al.*, 2006; Mack y Rudgers, 2008; Liu *et al.*, 2011). En América del Sur, estudios en gramíneas silvestres realizados en el campo y en el invernadero han demostrado que la colonización de la raíz por HMA se promueve en plantas E+ en comparación con las plantas E- (Novas *et al.*, 2005, 2009; Arrieta *et al.*, 2015; Vignale *et al.*, 2016, 2018, 2020, 2023). Además, en un estudio reciente en el campo, las plantas E+ de *Bromus auleticus* promovieron la colonización por HMA de vecinos agronómicos (Vignale *et al.*, 2020) (**Fig. 6**).

Sin embargo, una clase de interacción multitrófica que ha recibido poca atención es la que se establece entre las plantas, los endofitos fúngicos foliares y endofitos de raíz. Hasta donde sabemos, hay sólo unos pocos estudios que han evaluado la

interacción simultánea de *Epichloë*/DSE/HMA/gramínea (Vandegrift *et al.*, 2015; Slaughter y McCulley, 2016; Slaughter *et al.*, 2018, 2019). Estos autores han propuesto que la interacción múltiple depende de la fisiología del hospedante, la disponibilidad de inóculo, la interacción con los simbiontes y el medio ambiente. Estos estudios enfatizan que no es posible generalizar sobre las interacciones múltiples y destacan el papel clave del contexto ambiental, así como los antecedentes genéticos. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que hayan evaluado la interacción simultánea y diversidad asociada a *Epichloë*/DSE/*B. auleticus*.

El fósforo, su rol esencial en la nutrición y desarrollo de las plantas

El fósforo (P) es un elemento esencial que está presente en todos los suelos en formas tanto inorgánicas como orgánicas. Las formas inorgánicas derivan de la meteorización de la roca mineral primaria, incluyendo varias formas de apatita (Smeck, 1985). Tras la meteorización, el P inorgánico (Pi) se encuentra en la solución del suelo como ortofosfatos, incluyendo H_2PO_4 y HPO_4 . Dependiendo de las condiciones del suelo, los ortofosfatos pueden ser adsorbidos por complejos minerales, convirtiéndolos en formas insolubles (Kruse *et al.*, 2015). En suelos ácidos, están ligados tanto a óxidos de hierro y aluminio como a minerales arcillosos; sin embargo, en suelos alcalinos, están ligados principalmente al carbonato de calcio (Hinsinger, 2001). Además, los ortofosfatos solubles que no quedan adsorbidos son a menudo asimilados en varios sistemas biológicos; por lo tanto, aproximadamente entre el 30% y el 80% del P presente en el suelo está inmovilizado en diversas formas orgánicas (Dalai, 1977). La forma más común de P orgánico es el fosfato de inositol, que constituye aproximadamente el 60% del P orgánico total en el suelo (Dalai, 1977). El fosfato de inositol es estable y se forma por una serie de ésteres de fosfato que van desde monofosfatos hasta hexafosfatos. El fitato, o hexakisfosfato de inositol, es la forma más abundante de fosfato de inositol (Turner *et al.*, 2002). Otras formas de P orgánico incluyen fosfatos de glicerol, fosfolípidos, ácidos nucleicos y fosfatos de azúcar; todos estos están contenidos principalmente en la biomasa microbiana del suelo y, en conjunto, constituyen menos del 2% del P orgánico total del suelo (Stewart y Tiessen, 1987). Todas las formas de P orgánico en el suelo son no biodisponibles, es decir, no están

fácilmente disponibles para la absorción por las plantas, porque inherentemente tienen altos pesos moleculares y, por lo tanto, deben ser hidrolizadas en formas inorgánicas solubles, como el ortofosfato (Stewart y Tiessen, 1987).

El P juega un papel crucial en muchos procesos moleculares de las plantas, incluyendo la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis y estabilidad de membranas, la respiración, las vías de transducción de señales, la actividad enzimática y las reacciones redox (Ha y Tran, 2014). El P también es vital en la fotosíntesis, la formación de embriones y semillas, y la fijación biológica de nitrógeno (Ha y Tran, 2014). Debido a su papel fundamental en las plantas, la concentración en el suelo que está biodisponible para las raíces de las plantas es bastante baja (Bielecki, 1973). Así, cuando el suministro de P en el suelo no satisface la demanda de P de la planta, esto resulta en múltiples efectos adversos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo defoliación, intolerancia a factores de estrés biótico y abiótico, y una reducción significativa del rendimiento (Jain *et al.*, 2007).

Para satisfacer la demanda de alimentos de la creciente población humana, fertilizantes químicos a base de P (incluidos fosfato monoamónico, fosfato diamónico, superfosfato y diferentes formulaciones de nitrógeno-fósforo-potasio) han sido utilizado ampliamente en todo el mundo desde la década de 1960 (Carvalho, 2006). Aunque esta práctica ha demostrado ser eficaz para mitigar temporalmente los síntomas de la deficiencia de nutrientes de P en los cultivos, las aplicaciones frecuentes de fertilizantes de P en exceso, tienen impactos ambientales perjudiciales, incluyendo la eutrofización de los ecosistemas acuáticos debido a la lixiviación y drenaje del P residual de los campos agrícolas (Cade-Menun *et al.*, 2010; King *et al.*, 2015). Además, el P es un recurso no renovable, y las reservas conocidas de fosfato de roca, que actualmente abastecen la demanda agronómica de fertilizantes de P, son insostenibles y se estima que se agotarán en un plazo de 50 a 100 años (Dhillon *et al.*, 2017). Finalmente, entre el 75 y el 90% del P aplicado se precipita por complejos de hierro, aluminio o calcio presentes en el suelo, haciéndolo inaccesible para la planta en el primer año de aplicación (Cade-Menun *et al.*, 2010). La baja fertilidad del suelo y las altas aplicaciones de P también inhiben directamente a los microorganismos que pueden mejorar naturalmente la disponibilidad de P en los suelos (García *et al.*, 2015).

Las plantas adaptadas a suelos deficientes en P mejoran su adquisición y eficiencia en el uso de P mediante (1) cambios en los rasgos arquitectónicos de las raíces, (2) aumentando la tasa de mineralización de P a partir de minerales de roca, (3) removilizando fuentes orgánicas de P mediante la hidrólisis, (4) reemplazando fosfolípidos en las membranas con sulfolípidos y galactolípidos, o (5) empleando rutas metabólicas que pueden conservar P (Giehl y von Wieren, 2014). Sin embargo, la adaptación más importante a las condiciones de suelo limitantes en P es el desarrollo de interacciones con microbios del suelo (Raven *et al.*, 2018).

Un gran número de organismos microbianos, incluidos bacterias, hongos y algas, exhiben la capacidad de solubilización y mineralización de P. Para una mejor utilización del P acumulado en los suelos, los microorganismos solubilizadores de fósforo, capaces de transformar el P insoluble en formas solubles, pueden funcionar como biofertilizantes (Zhu *et al.*, 2012). El uso de biofertilizantes de P es un enfoque prometedor para mejorar la producción de alimentos a través del aumento del rendimiento agrícola, ya que es amigable con el medio ambiente (es decir, un paradigma que enfatiza el uso de enmiendas biológicas del suelo en lugar de productos químicos) (Babalola y Glick, 2012).

Entre los hongos con capacidad de solubilizar P se destacan cepas de: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*, entre otros (Srinivasan *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013). El estudio de la capacidad de solubilización de fosfatos presentes en el suelo por hongos DSE, se ha incrementado en los últimos años, uno de los primeros trabajos es el de Barrow y Osuna (2002) describieron la capacidad de *Aspergillus ustus*, el que describieron como un DSE. Desde entonces esta capacidad se ha documentado en cepas de origen y taxonomía diversos.

Hongos solubilizadores de fósforo y *Epichloë*

En relación con el efecto de la asociación *Epichloë*-gramínea sobre los hongos solubilizadores de fósforo, hasta el momento solo se conoce el estudio de Arrieta *et al.*, (2015). En este trabajo, se investigó la comunidad de hongos en la rizósfera de *Bromus auleticus*, comparando plantas E+ (asociadas a *E. pampeana*) y E-, así como suelos agrícolas y no agrícolas. Se lograron aislar 356 cepas de hongos, de las cuales 49 solubilizaron fosfato tricálcico en medio NBRIP agarizado. La caracterización morfológica reveló que la mayoría de estos hongos correspondían a

los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Talaromyces*. Cabe destacar que el estatus endofítico de *B. auleticus* influyó significativamente en la diversidad de hongos solubilizadores de fósforo (HSF) en la rizósfera, observándose una mayor diversidad en las plantas E+. Además, se registró una mayor diversidad de HSF en suelos no agrícolas en comparación con los suelos agrícolas. Por su parte, Stefanoni Rubio (2019) detectó diferencias en la solubilización de P, por parte de HSF, ya que no todas las cepas solubilizaron todas fuentes utilizadas, a su vez la concentración de exudados de raíces asociadas *Epichloë* presentó un incremento en la solubilización de P.

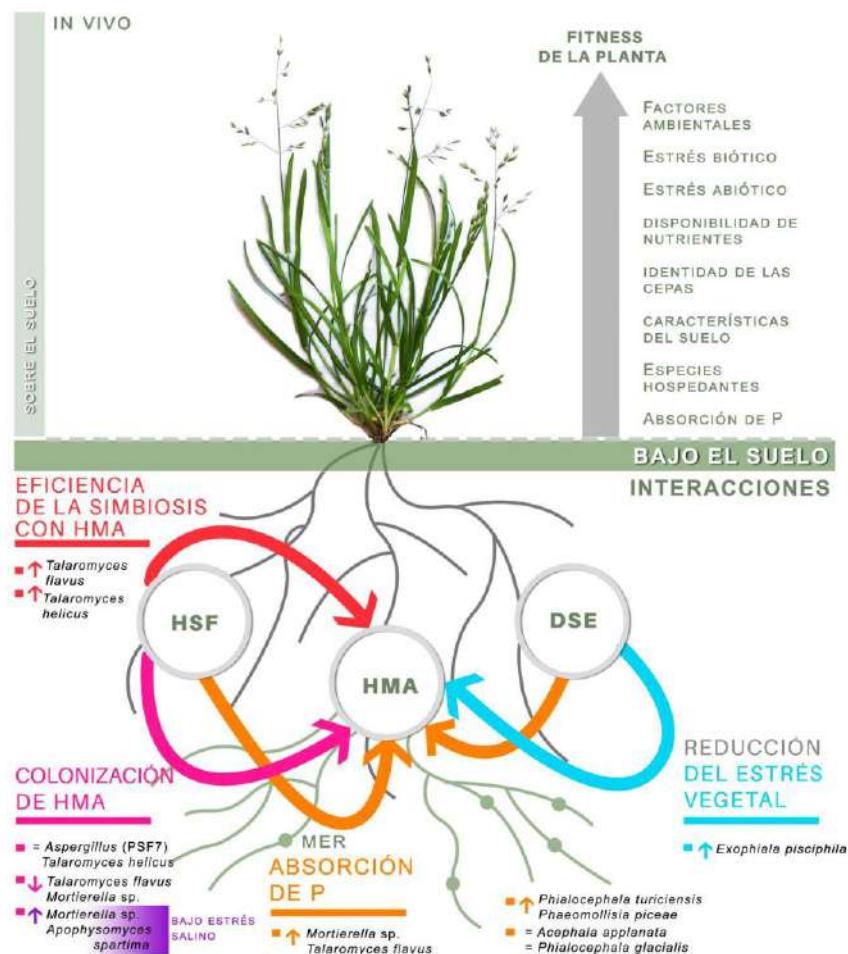


Fig 6. Esquema que resume los efectos de los hongos endofíticos bajo el suelo sobre la colonización de las raíces de los HMA y la eficiencia de la simbiosis, la absorción de P y la reducción del estrés de la planta basado en experimentos *in vivo*. Hongos micorrícos arbusculares (HMA); endofito septado oscuro (DSE); micelio extrarradical (MER); hongos solubilizadores de fósforo (HSF). Modificado de Della Monica *et al.*, (2021).

Forrajera *Bromus auleticus*

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

Las plantas son cespitosas, presentan rizomas breves y forman matas cuyas cañas pueden alcanzar hasta 1 m de altura (Burkart, 1969). Las panojas son erectas y pueden medir hasta 20 cm de longitud. Las espiguillas son grandes (2 a 3 cm) y portan entre 6 y 9 flores (**Fig. 7**).

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



Fig. 7. Plantas de *Bromus auleticus* en el campo experimental de la FCEN-UBA. **A.** Vista general de la planta. **B.** En estado de antesis. **C.** Con semillas. Fotos tomadas por Daniel Ruiz Mínguez y Natalia Terlizzi.

Como ya se ha mencionado, los efectos observados en el desarrollo de gramíneas asociadas a endofitos *Epichloë* pueden ser explicados por la producción de metabolitos incorporados al suelo a través de los exudados radiculares, siendo responsables de modular las comunidades de los microorganismos rizosféricos. Debido a que estas comunidades, a su vez, tienen un rol central en la utilización de los nutrientes y, por lo tanto, en promover el desarrollo del hospedante y de plantas vecinas, y considerando la información previamente presentada, es de interés abordar la interacción simultánea entre una gramínea nativa silvestre, los endofitos *Epichloë* y los endofitos DSE (Fig. 8). La intención es obtener una comprensión más completa de cómo estos tres organismos interactúan entre sí. Al adoptar un enfoque holístico, se busca desentrañar gradualmente los mecanismos complejos que están en juego en este sistema específico.

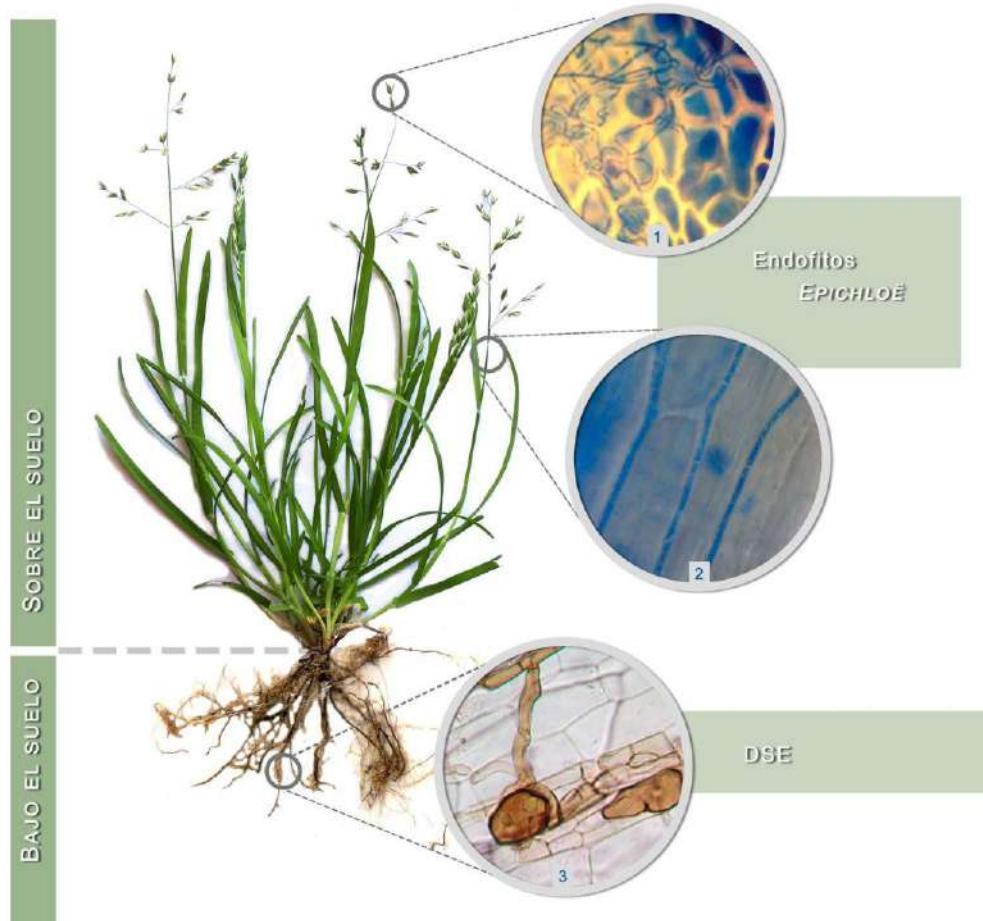


Fig. 8. Esquema general de los grupos funcionales aéreos y subterráneos de los endofitos fúngicos: (1) *Epichloë* en la semilla (transmisión vertical). (2) Endofitos *Epichloë* creciendo en tallos y hojas. (3) DSE, en las raíces. Todos ellos interactúan simultáneamente dentro de la misma planta. DSE, endofito septado oscuro. Modificado de Della Monica *et al.*, (2021).

HIPÓTESIS

La presencia simultánea de simbiontes funcionalmente distintos, que proporcionan diferentes beneficios a la planta, se evidencia en la promoción de la colonización del hospedante por parte de los mismos y su efecto conjunto beneficia a las plantas hospedantes

Particulares

Los endofitos *Epichloë*, en simbiosis con su hospedante, afectan la asociación de la raíz con endofitos septados oscuros (DSE), lo cual se evidencia en la riqueza y diversidad de los DSE asociados. Nuestra predicción es que la asociación con *Epichloë* se relaciona con una mayor diversidad y riqueza de DSE.

Los exudados de los endofitos *Epichloë* afectan de manera diferencial el crecimiento de cepas de DSE con diferentes estrategias nutricionales.

Predicción: Los exudados de endofitos *Epichloë* favorecerán el crecimiento de cepas de DSE endofíticas y son antagónicos para cepas de DSE patogénicas.

La asociación simultánea de *B. auleticus* con endofitos *Epichloë* y DSE, debido a ser simbiontes funcionalmente distintos y que proporcionan diferentes beneficios a la planta, se evidencia en propiedades emergentes (i.e. efectos distintos al esperado para cada simbionte en particular) que benefician a las plantas hospedantes. Se predice que la presencia de diferentes tipos de simbiontes incrementa el uso de los recursos de sus hospedantes, así como un aumento en la capacidad de absorción de P.

Objetivos Generales

Se proponen 3 objetivos generales que a su vez pueden estar asociados a objetivos particulares.

1. Evaluar el efecto de la simbiosis *Bromus auleticus-Epichloë* sobre la identidad de las cepas DSE asociadas a las raíces del hospedante.

Objetivos particulares

- Evaluar la naturaleza endofítica-patogénica de las cepas DSE a partir de ensayos de resíntesis.
- Identificar cepas de DSE, aisladas de raíces de *Bromus auleticus* asociadas o no al endofito *Epichloë*.
- Analizar el efecto de la asociación mutualista *Bromus auleticus-Epichloë* sobre la diversidad y riqueza de las cepas de DSE bajo estudio.
- Analizar la relación entre la identidad del hongo DSE, su comportamiento y frecuencia, en plantas de *Bromus auleticus* asociadas o no al endofito *Epichloë*.

2. Evaluar los caracteres asociados al tipo de interacción que establecen los endofitos DSE con *Bromus auleticus* y determinar el efecto de los endofitos *Epichloë* sobre estos rasgos. Identificar a los endofitos DSE en términos de características beneficiosas para el hospedante.

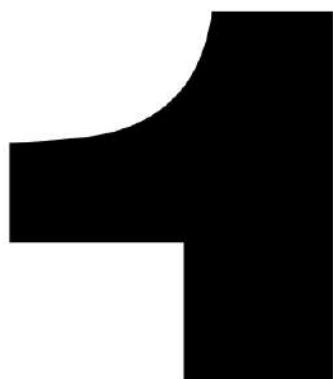
Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de las cepas DSE aisladas de *B. auleticus*.
- Analizar y establecer el grado de correlación entre los patrones de colonización en el hospedante y las tasas de crecimiento de las cepas DSE y su relación con su estrategia nutricional.
- Evaluar el efecto de los exudados de *Epichloë* sobre el desarrollo *in vitro* de cepas de DSE.
- Evaluar el efecto de una cepa de *Setophoma terrestris* sobre plantas adultas de *Bromus auleticus* asociadas o no a *Epichloë*.

3. Evaluar el efecto simultáneo de los endofitos *Epichloë* y DSE sobre el desarrollo del hospedante.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto conjunto de los endofitos *Epichloë* y de DSE sobre el desarrollo del hospedante.
- Cuantificar el contenido de fósforo en el tejido aéreo de plantas de *Bromus auleticus* asociadas o no a *Epichloë* e inoculadas o no con el DSE, con incorporación o no de una fuente de P inorgánica.
- Analizar el efecto de la asociación con *Epichloë* sobre el grado de colonización del DSE en las raíces de *Bromus auleticus*.
- Evaluar el impacto de la asociación simultánea de *B. auleticus* con endofitos *Epichloë* y endofitos DSE sobre los parámetros de crecimiento del hospedante.



Efecto de la asociación *Bromus auleticus-Epichloë*
sobre la diversidad y abundancia de
endofítos septados oscuros (DSE) en la raíz



Capítulo

INTRODUCCIÓN

Continuo mutualismo-parasitismo

La comunidad microbiana endofítica ha experimentado millones de años de coevolución dentro de la planta hospedante y ha dado como resultado la generación de una retroalimentación reactiva en la fisiología del hospedante (Poveda *et al.*, 2021). Se suele emplear el término holobionte para referirse a la planta y su microbioma o endobioma asociado, el que de manera similar a los sistemas ecológicos de los organismos superiores, muestra una dinámica interdependiente y compleja que actúa como un determinante esencial para el crecimiento y desarrollo general de la planta (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). Además, mientras que las plantas se originan a partir de semillas, el microbioma tiene una multitud de fuentes. El ensamblaje de estas comunidades depende de la interacción entre la plántula emergente y su entorno circundante, siendo el suelo la fuente principal (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2017). Estas comunidades microbianas son controladas por la planta a través de diferentes estrategias, como el perfil específico de exudados de la raíz y las respuestas de defensa (Olanrewaju *et al.*, 2019) pero a pesar de este control, el microbioma aún es capaz de adaptarse y prosperar.

La simbiosis con microorganismos es un fenómeno ubicuo con un impacto masivo en todos los organismos vivos. Los factores que alteran las interacciones interespecíficas son centrales en la ecología de estas asociaciones (El-Metwally *et al.*, 2023). El “continuo mutualismo-parasitismo” es un paradigma establecido como marco para explicar por qué las asociaciones simbióticas pueden desplazarse de mutualismos a parasitismos (Francis y Read, 1995; Saikonen *et al.*, 1998; Jones y Smith, 2004). En el caso particular de las interacciones planta-hongo, según este paradigma, las asociaciones compatibles entre el hospedante y el hongo producen respuestas en el hospedante que están delimitadas en un extremo por mutualismos obligados en los que los hospedantes no pueden sobrevivir en ausencia de sus simbiontes fúngicos y en el otro extremo por parasitismos, que conducen a la muerte de una planta hospedante debido a la presencia del hongo. Si bien la posición de cada asociación planta-hongo compatible a lo largo de este continuo resulta de interés y depende del contexto (Karst *et al.*, 2009), es necesario conocer los factores que operan en la variabilidad en estas simbiosis y cómo lo hacen. Estos

factores incluyen, entre otros, la variabilidad biótica de los hongos componentes (Munkvold *et al.*, 2004; Grünig *et al.*, 2008; Mandyam *et al.*, 2012; 2013) o plantas hospedantes (Jones *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1994; Karst *et al.*, 2009; Hoeksema *et al.*, 2010) así como la variabilidad abiótica en la disponibilidad de luz o nutrientes o en el estrés bajo el cual se evalúa la simbiosis hongo-hospedante (Johnson *et al.*, 1994; 1997; Redman *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2008).

La existencia de un continuo entre el mutualismo y el parasitismo ha constituido la alternativa más ampliamente aceptada para explicar el rango de respuestas posibles en diferentes asociaciones entre hongos y plantas. Tanto en el caso de otros hongos asociados a las raíces como los hongos micorrílicos arbusculares (HMA) (Johnson *et al.*, 1997, Jones y Smith 2004), o los endofitos foliares (Schulz y Boyle 2005; Schulz 2006), el caso de los hongos DSE no ha sido la excepción. Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad dentro del grupo, mientras algunos investigadores sugieren que se trata simplemente de habitantes ocasionales del entorno de la raíz, otros los consideran parásitos y muchos que se trata de hongos mutualistas (Mandyam y Jumpponen 2015).

Rango de respuestas de las plantas a los hongos DSE

En el marco de este paradigma, se ha tratado de definir la posición de los hongos DSE. En los últimos años se han incrementado los trabajos que documentan que los efectos de los hongos DSE resultan beneficiosos, no sólo para las plantas, sino también para los endofitos (He *et al.*, 2020; Akhtar *et al.*, 2022) y muchos han sido mencionados en la introducción general de esta tesis. Esto ha puesto de manifiesto la importancia de este grupo de hongos y sus posibles aplicaciones biotecnológicas (Li *et al.*, 2023), sobre todo en el ámbito agroindustrial debido a los efectos sobre la promoción del crecimiento e incrementos en la salud y productividad de las plantas. Gran parte de la bibliografía reciente muestra resultados alentadores que relacionan la colonización por hongos DSE con una mejor respuesta de las plantas a condiciones de salinidad, sequía, presencia de metales pesados y otras adversidades ambientales, sobre todo en vista de la creciente preocupación por el cambio climático global y la contaminación en agroecosistemas (Li *et al.*, 2023; Raza *et al.*, 2019). Otro ámbito en el que los hongos DSE se han destacado es en la industria farmacológica al mejorar el contenido de ingredientes activos en distintos

hospedantes (He *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023) o ser fuente de metabolitos bioactivos con diferentes propiedades (Lee *et al.*, 2017; Siless *et al.*, 2018; Tienaho *et al.*, 2019).

Sin embargo, ha habido informes de efectos neutrales y negativos de DSE en las plantas hospedantes. Es el caso de trabajos realizados con DSE del complejo de especies *Phialocephala fortinii*-*Acephala applanata* (PAC). Tellenbach *et al.*, (2011) informaron que algunas cepas causaron enfermedades en las plántulas de abeto, mientras que otras no tuvieron efectos nocivos, por lo que concluyeron que los efectos negativos o neutrales de estos DSE dependen de la cepa empleada. Por su parte, empleando especies de este complejo en plantas de abedul y abeto, Reininger *et al.*, (2012) mostraron que una de las cepas evaluadas originó respuestas opuestas en ambos hospedantes, reduciendo en forma significativa la biomasa en abeto, pero no en abedul. Además, en la mitad de las combinaciones cepa-hospedante, la biomasa vegetal se correlacionó en forma negativa con la biomasa endofítica. Resultados similares fueron reportados por Zhu *et al.*, (2015) en la planta medicinal *Epimedium wushanense*, quienes informaron que de siete aislamientos de hongos DSE, uno identificado como *Leptodontidium orchidicola* mejoró el crecimiento de la planta y el contenido de ingredientes activos, mientras que tres aislamientos no identificados provocaron la muerte de las plantas y, los tres restantes tuvieron un impacto negativo o neutral en el crecimiento de la planta y la acumulación de metabolitos bioactivos (Zhu *et al.*, 2015). Por su parte, Li *et al.*, (2018) también informaron los efectos positivos, neutrales y negativos de diferentes DSE sobre el crecimiento de *Ammopiptanthus mongolicus* en condiciones de sequía. Cepas de DSE perteneciente a *Phialophora* spp., *Paraconiothyrium* spp. y *Embellisia chlamydospora* generaron efectos positivos sobre el número de ramas y el contenido mineral de *A. mongolicus*, mientras que otras cepas de *Paraconiothyrium* spp. y de *Darksidea* spp. mostraron impactos negativos en los mismos parámetros (Li *et al.*, 2018). Por otra parte, al evaluar los efectos de la coinoculación de diferentes cepas de DSE, los resultados de la competencia entre ellas dependían de las cepas involucradas y así cuando una cepa inhibió el desarrollo de otra, también redujo el impacto de sus efectos. Por su parte Li *et al.*, (2019) al evaluar 4 cepas de diferentes especies de DSE en programas de restauración de regiones desérticas con *Hedysarum scoparium*, encontraron que los

efectos benéficos fueron particularmente notables en condiciones de estrés hídrico cuando inocularon las plantas con *Phialophora* sp. y *Leptosphaeria* sp. Sin embargo, cuando las plantas fueron inoculadas con *Embellisia chlamydospora* se observó una reducción notable en el crecimiento en condiciones de buen riego, comportamiento no observado cuando se expusieron al estrés hídrico. En resumen, se ha propuesto que el impacto de los hongos DSE, ya sea negativo o positivo, depende de la especie e incluso de la cepa y del aislamiento. Además las especies hospedantes también pueden jugar un papel de importancia (Mandyam y Jumpponen 2015; Li *et al.*, 2019).

Colonización de la planta hospedante: Importancia de los ensayos de resíntesis

En los trabajos con hongos DSE, independientemente de la búsqueda de cepas con potenciales aplicaciones, o en todo caso como medida previa para ello, es necesario establecer el papel de las cepas aisladas a partir de las raíces de la planta hospedante. Además, este aspecto es fundamental en estudios ecológicos (Schlaeppi y Bulgarelli 2015). Habitualmente, al realizar aislamientos de hongos, se consideraba suficiente emplear raíces sanas y asintomáticas para concluir que las cepas fúngicas obtenidas constituían hongos endofitos de raíz de acuerdo con la definición amplia de hongos endofitos (Wilson, 1995; Saikonen *et al.*, 1998). Sin embargo, en los últimos años, aunque emplear plantas sanas en su ambiente natural para los muestreos, resulta una medida fundamental, es muy importante realizar ensayos de resíntesis. Éstos son ensayos que consisten en establecer la asociación y evaluar tanto el comportamiento de las cepas al reinocularse en las plantas hospedantes, como las respuestas de éstas últimas. Se debe contar con cultivos puros y en buen estado de las cepas, las que, en general, se inoculan en semilla o en plántula en condiciones controladas. Este tipo de ensayos, aunque en cierto grado resultan un tanto artificiales, permiten clasificar el tipo de interacción que se establece y determinar si la presencia del hongo causa efectos negativos o beneficiosos en la planta hospedante. En algunos trabajos los ensayos de resíntesis se han realizado en macetas en cámara de crecimiento o en condiciones de invernáculo (Schadt *et al.*, 2001), sin embargo, es recomendable que la inoculación se realice en condiciones de esterilidad y que las plantas se mantengan en un sistema cerrado utilizando medio sintético como el medio Murashige y Skoog (MS) u

otro sustrato de crecimiento propicio para el hospedante. De este modo se intenta obtener resultados representativos del comportamiento del hongo. Por otra parte, aunque en algunos trabajos se han empleado plantas modelo o plantas de fácil acceso y observación como lo es el puerro (Mandyam y Jumpponen, 2008; Knapp *et al.*, 2012; 2018), es mejor utilizar el mismo hospedante del que fueron obtenidas las cepas (Ban *et al.*, 2012).

Los resultados de los ensayos de resíntesis pueden ser analizados en distintos niveles. El primero de ellos, es el macroscópico e incluye el análisis del estado general de la planta y de la presencia o no de síntomas tales como clorosis, marchitamiento, necrosis, defoliación y reducciones significativas en el crecimiento de las plantas. El segundo nivel es el análisis microscópico de las raíces. Este nivel es fundamental para corroborar la infección y colonización de los tejidos por parte de las cepas en evaluación, lo que implica principalmente el reconocimiento de hifas septadas, melanizadas, al menos parcialmente y microesclerocios en el interior de las raíces (Knapp *et al.*, 2012). Asimismo, en los ensayos de resíntesis, resulta clave realizar una minuciosa observación de las características del tejido colonizado. Alteraciones microscópicas como invaginaciones o papillas en membranas plasmáticas, degradación y engrosamiento de paredes celulares, desorganización celular, deposición de compuestos y muerte celular indican una relación patogénica (Yu *et al.*, 2001; Ohki *et al.*, 2002; Yonezawa *et al.*, 2004; Hashiba y Narisawa 2005; Zeilinger *et al.*, 2016; Rothen *et al.*, 2017).

Identificación y diversidad de los hongos DSE

Para explorar el potencial de los hongos endofitos presentes en un ambiente y/o diferentes nichos o asociados a determinado hospedante, es esencial determinar la diversidad de la comunidad, cuya composición está altamente influenciada por la edad, los tejidos y el genotipo de las plantas hospedantes (Kumar *et al.*, 2019). Tradicionalmente, la identificación de hongos endofíticos presentes en ambientes naturales ha sido limitada debido a la naturaleza no cultivable y no esporulante de la mayoría de los hongos endofíticos. En el caso particular de los hongos DSE, su identificación por medio de caracteres morfológicos ha resultado difícil debido a la ausencia de estructuras reproductivas (Mandyam y Jumpponen, 2015). Aunque Addy *et al.*, (2005), se han propuesto condiciones para inducir la esporulación *in*

vitro, como el empleo de medios específicos y una incubación prolongada a bajas temperaturas, ha sido necesario recurrir a la aplicación de métodos moleculares para su identificación (Grünig *et al.*, 2011). Además, una herramienta que se ha empleado como primer acercamiento para caracterizar hongos DSE es la clasificación en base a morfotipos propuesta por Lacap *et al.*, (2003). En ella se propone agrupar los aislamientos en base a una serie de características relacionadas con la velocidad de crecimiento, color, textura y morfología de las colonias tanto en el anverso como en el reverso de cultivos puros. Estas agrupaciones presentan una alta correlación entre las secuencias de ADN de los aislamientos incluídos en un mismo morfotipo (Lacap *et al.*, 2003) y constituyen muchas veces un paso previo de gran utilidad antes del empleo de técnicas moleculares.

Los avances en las técnicas moleculares, principalmente la secuenciación del espaciador interno transrito (ITS) del ADNr nuclear en el caso de cultivos de cepas aisladas, y en los años recientes, las técnicas de metagenómica, particularmente la pirosecuenciación, han facilitado el procedimiento de identificación de estos hongos. Sin embargo, aunque es necesario destacar que las técnicas de metagenómica han favorecido el desarrollo de un acervo genético de hongos endofíticos beneficiosos, no se utilizan para cultivos puros de hongos aislados, sino para establecer patrones de distribución y preferencias ecológicas distintivas. En el caso de los hongos DSE, el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con secuencias ITS resultan las más aceptadas y son las que se han empleado en las últimas décadas (Grunig *et al.*, 2011, Kia *et al.*, 2017). En general, en el desarrollo de cebadores para realizar PCR con el fin de evaluar la diversidad fúngica en el suelo ha sido el grupo de genes rRNA y, a pesar de sus limitaciones, el gen 18S rRNA, el más utilizado, explotando tanto las regiones conservadas como las variables que contiene (Kia *et al.*, 2017). Sin embargo, el empleo de las regiones espaciadoras de ADNr no codificantes, como las secuencias ITS, se benefician de una rápida tasa de evolución, lo que da como resultado una mayor variación de secuencia entre especies estrechamente relacionadas en comparación con las regiones codificantes más conservadas del grupo de genes de ADNr. Por lo tanto, en hongos, estas secuencias generalmente proporcionan una mayor resolución taxonómica que las secuencias generadas a partir de regiones codificantes (Lord *et al.*, 2002; Anderson

et al., 2003). White y sus colegas (1990) diseñaron los primeros cebadores de PCR para la amplificación de regiones de ADNr 18S e ITS de hongos a partir de ADN extraído. Aunque éstos se diseñaron con información de secuencias de referencia limitada, demostraron ser herramientas muy poderosas y todavía son ampliamente utilizadas. Son especialmente útiles tratándose de cultivos puros y se los ha considerado como marcadores estándar para códigos de barras de ADN de hongos. Esto ha permitido contar con una buena base de datos que permite la identificación a nivel de género e inclusive, de especie. Además es posible hacer filogenias cuando se desea responder a preguntas relacionadas con procesos evolutivos y de especiación o análisis de la influencia de la filogenia y otros caracteres del hongo en su interacción con las plantas, aunque generalmente se complementan con el empleo de otras secuencias (Kia *et al.*, 2017). Más recientemente, técnicas como el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y la espectrometría de masas MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization- time of flight), entre otras, también han sido empleadas como complemento para la identificación rápida y eficiente de hongos tanto dependientes como independientes del cultivo (Kumar *et al.*, 2019).

Los hongos DSE constituyen un grupo polifilético actualmente distribuido en más de 40 clases, 100 órdenes y unas 1500 especies pertenecientes a diferentes órdenes del Phylum Ascomycota. Curiosamente, como ya se ha mencionado, estos endofitos se han aislado de diversos hospedantes y a partir de un amplio rango de hábitats, inclusive a partir de plantas que crecen en condiciones extremas. Como consecuencia, se estima que es un grupo altamente diverso. Algunos investigadores consideran que esta enorme diversidad puede estar correlacionada con su papel beneficioso decisivo en el ecosistema y sus procesos (Wani *et al.*, 2015; Sampangi-Ramaiah *et al.*, 2020). La mayoría de los estudios de diversidad pertenecen a diferentes ecosistemas del hemisferio Norte. Se ha podido establecer que una alta proporción de especies de DSE puede ser incluida principalmente dentro de los órdenes Heliotiales, Pleosporales, Sordariales o Pezizales. Trabajos recientes también han identificado DSE pertenecientes a géneros de los órdenes Chaetothyriales, Calosphaerales, Eurotales, Hypocreales, Magnaportheales, Microascales, Xylariales, Leotiales, Capnodiales y Chaetosphaerales (Newsham 2011; Knapp *et al.*, 2012; Mandyam y Jumpponen 2015; Santos *et al.*, 2021). Entre

los géneros de hongos DSE que han sido aislados con mayor frecuencia o que han sido caracterizados con mayor profundidad se pueden mencionar a *Cadophora*, *Microdochium*, *Trichocladium* y especialmente *Phialocephala* (Grünig *et al.*, 2008). El género *Phialocephala* incluye especies estrechamente relacionadas filogenéticamente, que son indistinguibles y que se agrupan en el complejo de especies denominado PAC. Los DSE más frecuentes en los ecosistemas forestales naturales del hemisferio norte pertenecen al PAC (Stoyke y Currah, 1991; Addy *et al.*, 2005; Grünig *et al.*, 2011; Strohaker *et al.*, 2021). *Phialocephala fortinii* fue descrita por primera vez en asociación con *Pinus sylvestris* por Wang y Wilcox (1985). Desde entonces, esta especie se ha encontrado en muchos ambientes, sobre todo del hemisferio norte. Por otro lado, otro complejo de especies con amplia distribución es el altamente polimórfico *Phialophora/Cadophora* (Chaetothyriales/Helotiales) y *Harpophora* (Magnaporthales) con anamorfos en los géneros *Gaeumannomyces* y *Magnaporthe* (Gams, 2000; Yuan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). *Phialophora* comprende especies que colonizan ampliamente árboles y, en menor medida, plantas herbáceas, mientras que el género *Harpophora* se asocia típicamente con las raíces de plantas herbáceas, principalmente Poaceae (Berthelot *et al.*, 2017; Likar y Regvar, 2009; Sieber, 2002). Aunque la investigación de DSE está aumentando, nuestro conocimiento sobre la diversidad de estos hongos sigue siendo limitado (Santos *et al.*, 2021). La clasificación dentro de este grupo se ha actualizado gradualmente y aún está en actualización. Permanentemente se están describiendo nuevas especies, pero también se cuenta con muchos aislamientos que aún no tienen un posicionamiento taxonómico adecuado (Yuan *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2015; Malicka *et al.*, 2022).

Diversidad de los hongos DSE en Argentina

En nuestro país la mayoría de los estudios se han limitado a analizar la colonización de diversas plantas hospedantes en distintas regiones y en muchos de ellos se ha correlacionado con la colonización por distintos tipos de micorrizas. Los trabajos de aislamiento e identificación, con análisis de la comunidad de DSE son muy escasos. Puede mencionarse un estudio preliminar en el que se aislaron hongos DSE asociados a la especie endémica *Puccinellia frígida* asociada a humedales hipersalinos de Laguna Brava, una laguna altoandina con condiciones climáticas extremas, ubicada en la provincia de La Rioja. Del total de aislamientos, que se

agruparon en 5 órdenes diferentes, la mayoría pertenecieron a los géneros: *Alternaria*, *Embellisia*, *Emericellopsis*, *Cadophora*, *Gaeumannomyces* y *Aureobasidium*, muchas de ellas mostraron elevada tolerancia a la salinidad (Cisneros *et al.*, 2014). Por su parte Rothen *et al.*, (2017) estudiaron la comunidad de estos endofitos, asociada a plantas de soja de campos de la provincia de Buenos Aires, muestreadas en dos etapas fenológicas. Se pudo establecer que la identidad y la frecuencia de los aislamientos fue diferente en cada etapa de crecimiento del cultivo. Los aislamientos obtenidos pertenecieron en su mayoría al orden Pleosporales, pero se encontraron también unos pocos aislamientos de géneros pertenecientes a los órdenes Capnodiales, Botryosphaeriales y Helotiales. Algunos taxones como *Boeremia* sp., *Cadophora* sp., *Coniothyrium* sp., *Corynespora cassiicola*, *Peyronellaea* sp. y *Phaeosphaeria* sp., se aislaron exclusivamente de plántulas, mientras que en la etapa reproductiva fueron especies exclusivas *Curvularia trifolii*, *Cladosporium* sp. y *Macrophomina phaseolina*, esta última con comportamiento claramente patogénico. Dos especies frecuentes que se encontraron en ambas etapas fenológicas, fueron *Paraphoma radicina* y *Alternaria alternata*. Sus observaciones respaldan la hipótesis del cambio en el consorcio de estos hongos según la etapa de desarrollo del hospedante. Por su parte, Pescie *et al.*, (2021) analizaron la presencia de hongos endofitos en las raíces de diferentes cultivares de arándano provenientes de tres zonas productoras. Sus resultados revelaron una gran variación tanto entre las zonas como entre los cultivares. Además, identificaron que algunos de los hongos endofitos presentaron una función patogénica. Entre los géneros más frecuentes pueden mencionarse *Oidiodendron*, *Humicola* y *Coremiella*. Dos especies del género *Oidiodendron*, *O. maius* y *O. echinulatum*, mostraron comportamiento micorrílico del tipo ericoide. En uno de los trabajos más recientes, Echeverría *et al.*, (2024) aislaron e identificaron hongos endofíticos, entre ellos algunos DSE, a partir de raíces de un cultivo comercial de cebada. Los aislamientos pertenecieron a cuatro órdenes: Pleosporales, Xylariales, Hypocreales y Chaetothyriales. Entre los hongos DSE fueron identificados *Exophiala equina*, *Curvularia arcana* y *Microdochium* sp., los que, además, fueron capaces de solubilizar fosfatos. También debe mencionarse el trabajo de Miranda *et al.*, (2020) quienes trabajaron con taxones de hongos coprófilos asociados a heces de un roedor herbívoro subterráneo del género *Ctenomys* (tuco-tuco), en el bioma Monte Desierto del noroeste argentino. Con el objetivo de caracterizar la naturaleza de la

interacción entre dichos hongos y las plantas hospedantes, aislaron numerosas cepas que se comportaron como hongos DSE cuando se asociaron con las raíces, aunque no siempre formaron microesclerocitos. Todas pertenecieron al mismo clado dentro de la familia Lasiosphaeriaceae del orden Sordariales, los géneros más frecuentes fueron *Zopfiella* y *Cercophora*. Este trabajo demostró que este roedor presenta capacidad para dispersar hongos de las raíces dentro de sus heces, específicamente HMA y DSE.

La información disponible revela, por un lado, que queda mucho por explorar dentro de este grupo de hongos y, por otro, que existen importantes diferencias entre las comunidades de hongos DSE nativas y las registradas para el hemisferio norte. La identidad de las cepas presentes en ambientes naturales y agrícolas son esenciales para establecer el papel en los ecosistemas, sus implicancias en el establecimiento y colonización por las plantas hospedantes, su potencial como bioinoculantes y su importancia biotecnológica en general.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Los endofitos *Epichloë* modulan la comunidad fúngica asociada a las raíces de *Bromus auleticus*, favoreciendo mayor diversidad y riqueza en las comunidades de hongos DSE.
- Las plantas de *Bromus auleticus* asociadas a endofitos *Epichloë* favorecen la colonización por hongos DSE con comportamiento no patogénico.

OBJETIVOS PARCIALES

- Evaluar la naturaleza endofítica-patogénica de las cepas DSE a partir de ensayos de resíntesis.
- Identificar cepas de DSE, aisladas de raíces de *Bromus auleticus* asociadas o no al endofito *Epichloë*.

- Analizar el efecto de la asociación mutualista *Bromus auleticus-Epichloë* sobre la diversidad y riqueza de las cepas de DSE bajo estudio.
- Analizar la relación entre la identidad del hongo DSE, su comportamiento y frecuencia, en plantas de *Bromus auleticus* asociadas o no al endofito *Epichloë*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante mi tesina de Licenciatura (Terlizzi, 2018), se obtuvieron aislamientos, clasificados como potenciales DSE a partir de raíces de *Bromus auleticus* sanas, asociadas (E+) y no asociadas (E-) al endofito de vástago *Epichloë*. Las plantas se encontraban en la estación experimental agrícola del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Concepción del Uruguay (provincia de Entre Ríos, Argentina). En este capítulo se llevó a cabo lo siguiente:

- Evaluar la naturaleza endofítica de los aislamientos y sus efectos en *B. auleticus* mediante ensayos de resíntesis en un sistema cerrado
- Identificar las cepas mediante técnicas moleculares como PCR y análisis filogenéticos
- Establecer la diversidad de la comunidad de hongos DSE asociada a plantas E+ y E- y realizar un análisis ecológico comparativo.

Ensayo de resíntesis

Para establecer la naturaleza simbiótica de los hongos, se procedió a realizar un ensayo de resíntesis en condiciones de esterilidad. Para ello, las semillas de *B. auleticus* se trataron con ácido sulfúrico al 50% durante 30 minutos para eliminar la palea y la lemma y posteriormente, se lavaron con agua de la canilla seguida de NaClO (50 %) durante 1 hora. Por último, fueron enjuagadas con agua estéril. Todos los pasos mencionados se realizaron en condiciones de agitación. Este procedimiento permite eliminar la palea y lemma, sin dañar el embrión y luego proceder con la esterilización superficial de la semilla. Las semillas se incubaron a 23 °C en placas de Petri (Ø 9 cm) con papel de filtro humedecido con 2 ml de agua destilada esterilizada. Cuando las radículas de las plántulas alcanzaron una longitud de 2 cm, fueron inoculadas con los hongos endofitos.

Cada plántula fue transferida a una placa de Petri que contenía una colonia fúngica en activo crecimiento sobre agar extracto de malta (AEM), colocando las raíces en contacto con la colonia. En el tratamiento control, las plántulas se colocaron en placas de Petri que contenían AEM sin la colonia fúngica. A continuación, las placas de Petri se incubaron en una cámara de cultivo con un ciclo de 16 horas de luz a 25 °C durante 5 días. Despues de este periodo, cada plántula fue transferida a un tubo (de 2,5 cm de diámetro y 25 cm de altura) con 20 ml de vermiculita y solución de

Hoagland estériles. Finalmente, los tubos se colocaron en una cámara de cultivo a 22 °C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, durante 30 días. Al término del experimento, se analizó el estado general de las plantas, prestando atención a síntomas como clorosis, marchitamiento, necrosis, caída de hojas o marcada inhibición del crecimiento.

Una vez que las plantas fueron cosechadas, el sistema radical fue dividido en dos submuestras, una de ellas se empleó para realizar el re-aislamiento del hongo DSE, mientras que la otra submuestra fue clarificada y teñida con el fin de corroborar la presencia del hongo en el interior de las raíces y cuantificar el nivel de colonización. Para re-aislar las cepas de DSE, se sometió la submuestra del sistema radical correspondiente, a una esterilización superficial. Esto se consiguió mediante un lavado secuencial en etanol al 70% durante 30 segundos, seguido de una inmersión en NaClO al 10% durante 3 minutos y, finalmente, etanol al 50% durante 30 segundos. Luego, las raíces se cortaron en fragmentos de no más de 5 mm y se colocaron en cajas de Petri con AEM. Se sembraron 5 fragmentos por placas y se incubaron en la oscuridad a 25°C. Se realizaron observaciones periódicas bajo lupa binocular para detectar hifas emergentes de los extremos de cada fragmento.

La submuestra restante del sistema radicular se conservó en solución FAA (formaldehído:ácido acético:etanol; al 10%, 5%, 50%, en agua destilada) hasta que se pudo proceder con la clarificación con KOH 10% por 15 minutos, neutralización con HCl 0.2 N durante 3 minutos y finalmente tinción con Trypan Blue 0.02% por 15 minutos, según el protocolo de Phillips y Hayman (1970). Esta tinción permitió observar las estructuras fúngicas al microscopio óptico (**Fig 1.1**).

Identificación de los aislamientos fúngicos de DSE

Si bien algunas de las cepas fueron identificadas morfológicamente, gran parte de ellas no originaron estructuras reproductivas (Terlizzi, 2018). Por lo tanto, se procedió a emplear técnicas moleculares con el fin de identificar todas las cepas y corroborar las identificaciones morfológicas realizadas previamente. La identificación se confirmó a nivel de especie mediante técnicas moleculares.

-Extracción de ADN

Para obtener ADN genómico, se partió de cultivos puros de cada aislamiento en AEM. A partir de cada colonia se procedió al cultivo e incubación de cada cepa en

caldo de extracto de malta (CEM) en cámara con condiciones controladas de temperatura (25 °C) y oscuridad. La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el kit de aislamiento de ADN microbiano UltraClean® (Mo Bio Laboratories INC., Carlsbad, CA, EE.UU.). Posteriormente, se realizó una cuantificación del ADN utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay de Invitrogen, para conocer la cantidad de ADN con la cual se trabajaba y así ajustar la cantidad de ADN genómico durante la amplificación (**Fig. 1.1**)

-Amplificación y secuenciación de las secuencias de ADN

Se procedió a realizar la amplificación de la región de los espaciadores transcritos ribosómicos internos (ITS) utilizando los cebadores ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la PCR la mezcla de reacción se realizó con 50 µl de volumen final de una mezcla que contenía 1-3 µl de ADN genómico, 37-39 µl de agua Milli-Q y se utilizaron 10 µl de PCR-mix. La PCR-mix contenía, 10 mM de dNTP, 10x de Buffer de reacción TAS, 3 mM de MgCl₂, 100 µM de cebadores ITS4, 100 µM de cebadores ITS5 y 5000 U/ml de ADN polimerasa T-Holmes (Inbio Highway). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturación (94 °C durante 2 min), 35 ciclos de desnaturación (94 °C durante 20 s), apareamiento a 53,5 °C (40 s), extensión a 72 °C (1 min 50s) y una extensión final a 72 °C (4 min). Los productos de la PCR fueron cuantificados utilizando un NanoDrop, previo al envío de los mismos para su secuenciación y purificación por el servicio de genotipado de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) mediante el método Sanger.

-Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit 7.2.5 y se compararon con secuencias del GenBank (NCBI) mediante BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W del Mega X (Kumar *et al.*, 2018) se sometieron al método de máxima verosimilitud y al modelo general reversible en el tiempo (Nei y Kumar 2000) con análisis de Bootstrap con 1000 réplicas para el soporte de los nodos (Felsenstein 1985). Siempre que estuvieron disponibles, se utilizaron secuencias de materiales tipo.

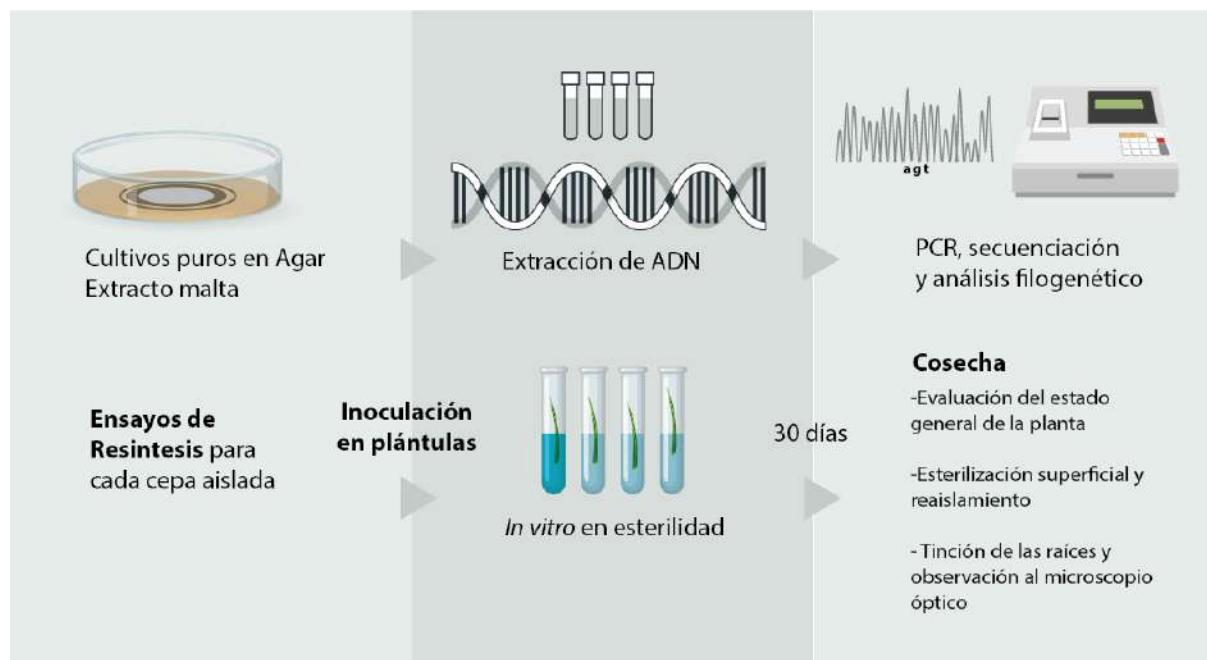


Fig. 1.1 Esquema de la metodología a seguir para identificación de cepas DSE y ensayo de resíntesis.

Análisis de la diversidad y la riqueza

Para comparar la riqueza y abundancia de especies entre plantas E+ y E-, se utilizaron los índices de Shannon-Wiener (H) y Simpson (D). El índice H', tiene en cuenta la riqueza y la uniformidad, dando información independientemente del tamaño de la muestra considerada (Poole 1974), mientras que el índice D es sensible a la abundancia de una o dos de las especies más comunes de la comunidad (Simpson, 1949). Su valor oscila entre 0 y 1; valores próximos a cero indican que la comunidad es diversa, es decir, las especies presentes están igualmente representadas, con valores próximos de frecuencia, mientras que valores próximos a 1 indican la existencia de especies dominantes y, por ende, menor diversidad. Como complemento a este análisis, se realizó un análisis estadístico para comparar la riqueza en DSE entre los diferentes estados de *Epichloë*. Los análisis emplearon un Modelo Lineal Generalizado (MLG) ajustado por máxima verosimilitud con una distribución de Poisson.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando como variables a las 14 especies de DSE identificadas en los aislamientos obtenidos de las 12 plantas. Se incluyó la opción `scale=TRUE` para estandarizar las variables, lo que implica que se trabajó con la matriz de correlación en lugar de la matriz de

covarianza. Esto asegura que todas las variables contribuyan equitativamente al análisis, independientemente de sus unidades de medida o varianza. Los puntajes de las muestras en las primeras tres componentes principales fueron extraídos y se calculó la correlación entre estos puntajes y las variables originales para identificar las variables más influyentes en las componentes principales. Adicionalmente, se evaluó la significancia estadística de las correlaciones utilizando pruebas de correlación de Pearson, y se calcularon los valores de p correspondientes. Finalmente, se analizó la relación entre las componentes principales y la variable “estatus endofítico de la planta de origen”, para determinar su influencia en la estructura de los datos. Los análisis se realizaron con el paquete “vegan” en el entorno R. Todos los análisis se realizaron utilizando el entorno R, versión 4.3.0 (2023-04-21, ucrt).

RESULTADOS

Identificación de los aislamientos fúngicos de DSE

Se identificaron 29 cepas de hongos mediante técnicas moleculares, aisladas de plantas sanas de *B. auleticus*: 18 de plantas E+ (Fig 1.2) y 11 de plantas E- (Fig 1.3). Estas cepas se caracterizaron por la presencia de melaninas en cultivos en AEM. De estas, 7 fueron identificadas a nivel de género y 22 a nivel de especie.

La Figura 1.3 muestra el árbol filogenético obtenido mediante el método de máxima verosimilitud.

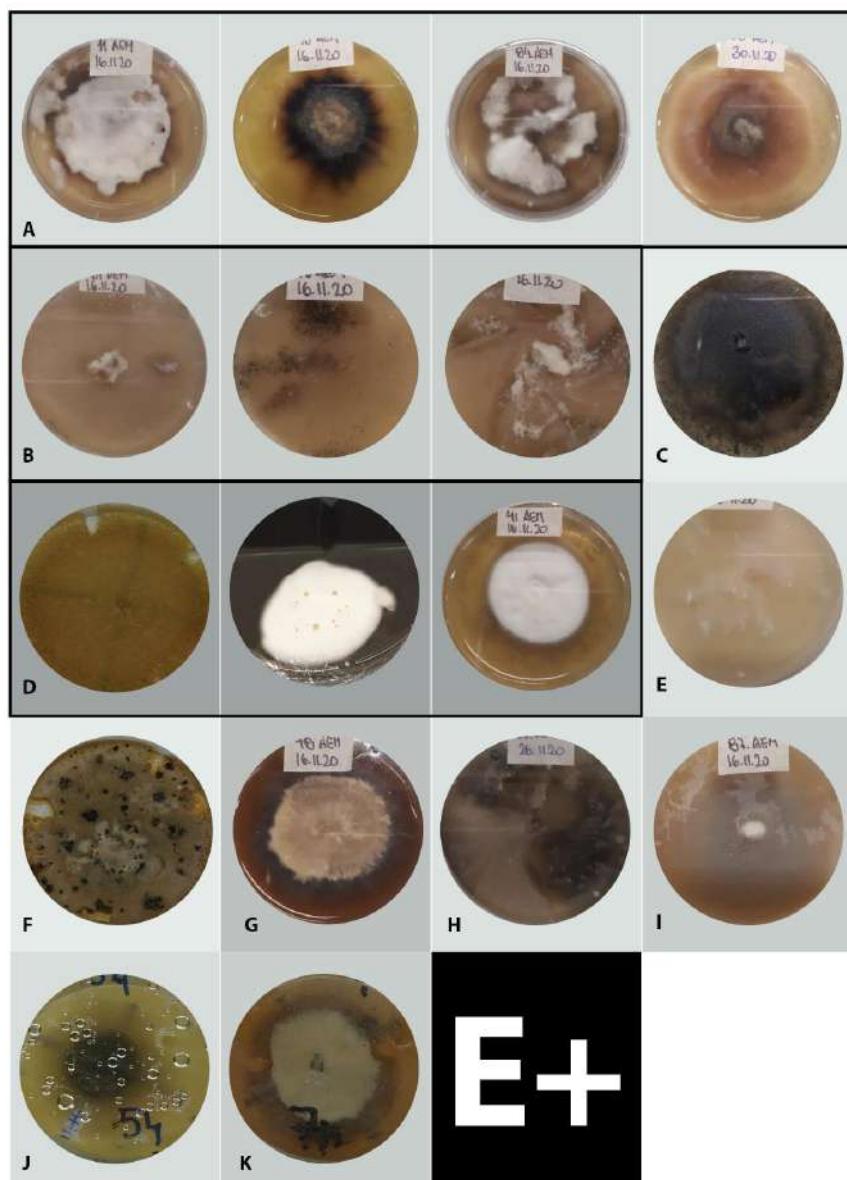


Fig 1.2. Cepas DSE aisladas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* e identificadas molecularmente como A. *Setophoma terrestris* B. *Microdochium bolleyi* C. *Magnaportheopsis* sp. D. *Simplicillium lamellicola* E. *Thelonectria blackeriella* F. *Epicoccum* sp. G. *Poaceascoma helicoides* H. *Microdochium trichocladiopsis* I. *Periconia macrospinosa* J. *Hymenoscyphus* sp. K. *Dactylonectria* sp.

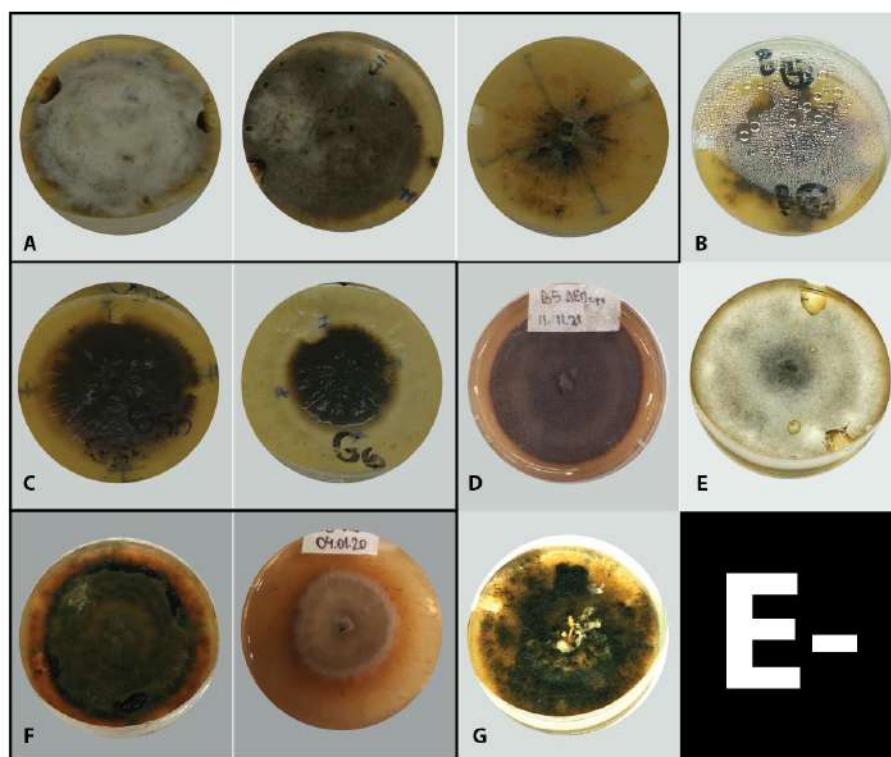


Fig 1.3. Cepas DSE aisladas de *Bromus auleticus* no asociadas a *Epichloë* e identificadas molecularmente como A. *Setophoma terrestris* B. *Tetraplosphaeria* sp. C. *Herpotrichia* sp. D. *Exophiala tremulae* E. *Periconia macrospinosa* F. *Poaceascoma helicoides* G. *Microdochium bolleyi*

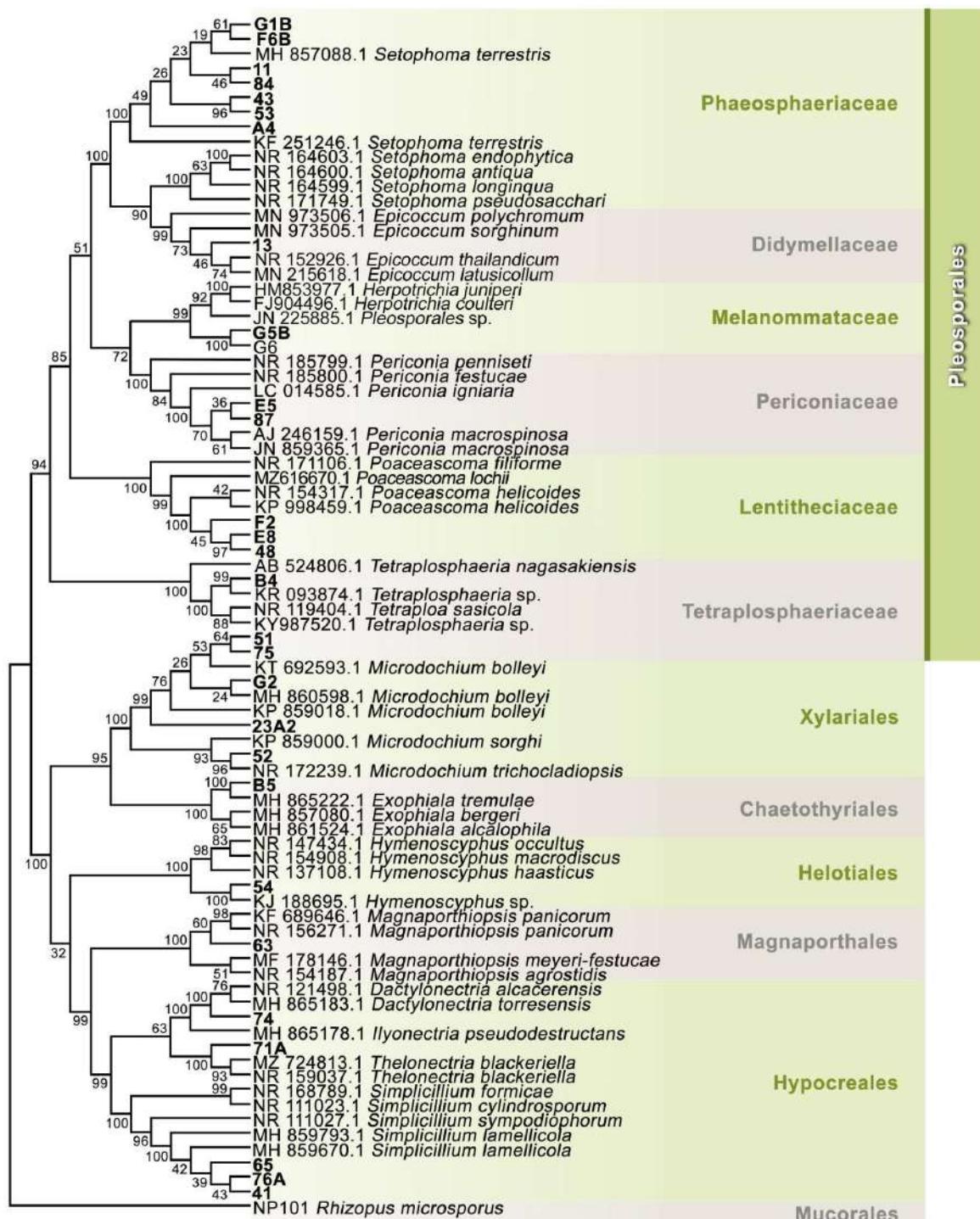


Fig 1.4. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud, a partir de aislamientos de endofitos septados oscuros (DSE), de las raíces de *B. auleticus*, asociadas o no a *Epichloë*, basado en secuencias de los ITS ADNr. Modelo evolutivo: General Reversible en el Tiempo. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap. Grupo externo: *Rhizopus microsporus*.

Ensayo de Resíntesis

El ensayo de resíntesis (**Fig 1.5**) permitió establecer que, de las 18 cepas aisladas de plantas E+, 11 mostraron comportamiento endofítico y sólo 7 fueron patogénicas. En contraste, en las plantas E-, la mayoría presentó comportamiento patogénico, ya que sólo 3 de las 11 cepas se comportaron como endofíticas, (**Tabla 1.1**).



Fig 1.5. Etapas del ensayo de resíntesis, inoculación de las plántulas mediante el contacto de las raíces con la colonia fúngica. Luego, trasplante a tubos de ensayos con vermiculita como sustrato de crecimiento. Incubación en cámara a 24 °C con fotoperíodo de 16 hs luz/8hs oscuridad durante 30 días. Finalmente se evaluó el estado general de la plántula y se tiñeron las raíces para observar estructuras fúngicas.

Tabla 1.1. Identificación y estatus endofítico de las cepas aisladas de plantas de *B. auleticus* E+ y E-, y sintomatología y colonización de DSE asociada a las plántulas durante la resíntesis. ID=identificación molecular usando los cebadores ITS4 e ITS5. HSH= hifas septadas hialinas, HSO = hifas septadas oscuras. El color verde se asoció a cepas endofíticas y el rojo a cepas patogénicas a partir del ensayo de resíntesis.

Estatus <i>B. auleticus</i>	Cepa	Código	ID	Estatus endofítico	Sintomatología	Colonización
					Macroscópica	Microscópica
E+	1	11	<i>Setophoma terrestris</i>	Endofítica	plantas sanas, similares al control	Presencia de HSO y microesclerocios intra e intercelulares
	2	43		Patogénica	Plántulas pequeñas, raíces rosadas.	HSH intrarradicales y extrarradicales. Presencia de microesclerocios
	3	53		Patogénica	Plantas necrosadas en la base. La mitad muertas. Presencia de micelio en sustrato asociado a la base del tallo.	Hifas superficiales envolviendo a la raíz (Abundante micelio extrarradical)
	4	84		Patogénica	Plantas con poca raíz, láminas amarillentas. Presencia de micelio en semilla.	Abundante micelio extrarradical.
	5	13		Patogénica	Plantas pequeñas muy débiles	Micelio extrarradical
	6	48		Endofítica	Plantas sanas con abundante biomasa radicular	HSH e HSO intra e intercelulares
	7	54		Patogénica	Reducción del porcentaje de plantas sobrevivientes, las que presentaron láminas secas y escaso desarrollo de raíz.	HSH extrarradicales rodeando la raíz
	8	23A2	<i>Microdochium bolleyi</i>	Endofítica	Plantas en buen estado.	HSO y abundante presencia de microesclerocios intra e intercelulares
	9	75		Endofítica	Plantas sanas.	HSO y microesclerocios intra e intercelulares
	10	51		Patogénica	Poca biomasa radicular	Hifas extrarradicales envolviendo a la raíz
	11	52	<i>Microdochium trichocladiopsis</i>	Endofítica	Plantas sanas.	HSO y microesclerocios intra e intercelulares
	12	41	<i>Simplicillium lamellicola</i>	Endofítica	Plantas sanas	HSH intracelulares e intercelularmente

E+	13	76A	<i>Simplicillium lamellicola</i>	Endofítica	Plantas sanas	HSH intracelulares e intercelulares
	14	65		Patogénica	Reducción del porcentaje de plantas sobrevivientes, las que presentaron escaso desarrollo de raíz. Plantas con poca raíz y plantas que no sobrevivieron a la inoculación. Micelio en sustrato	Poco material para cuantificar debido a la escasa cantidad de las raíces
	15	63	<i>Magnaportheopsis</i> sp.	Endofítica	Parte aérea y radicular en buen estado	HSH intracelulares e intercelulares
	16	71A	<i>Thelonectria blackeriella</i>	Endofítica	Plantas sanas, raíces delgadas algunas oscuras.	HSH, HSO y presencia de microesclerocitos hialinos intra e intercelulares
	17	74	<i>Dactylolectria</i> sp.	Endofítica	Plantas pequeñas pero en buen estado	HSH intrarradicales y extrarradicales
	18	87	<i>Periconia macrospinosa</i>	Endofítica	Plantas sanas	HSH, HSO y presencia de microesclerocitos intra e intercelulares
E-	1	A4	<i>Setophoma terrestris</i>	Patogénica	Plantas necrosadas en la base, raíces de coloración rosado.	Microesclerocitos y gran cantidad de micelio extrarradical.
	2	G1B		Patogénica	Raíces de coloración rosado oscuro	Micelio extrarradical evidente
	3	F6B		Endofítica	Plantas sanas	HSH intracelulares
	4	G5B	<i>Herpotrichia</i> sp.	Endofítica	Plantas sanas	HSH intracelulares e HSO intercelulares
	5	G6		Patogénica	Plantas con láminas amarillas y una muerta, micelio en sustrato.	HSH intra y extrarradicales.
	6	B4	<i>Tetraplosphaeria</i> sp.	Patogénica	Plantas pequeñas, lámina con ápices amarillos. Micelio en sustrato	Gran cantidad de HSH extrarradicales
	7	E5	<i>Periconia macrospinosa</i>	Endofítica	Plantas sanas	Microesclerocitos hialinos intracelulares
	8	F2	<i>Poaceascoma helicoides</i>	Patogénica	Plantas pequeñas, poca raíz. Micelio en sustrato	Gran cantidad de micelio extrarradical. HSH intra e intercelulares.
	9	E8		Patogénica	Plantas pequeñas, poca raíz.	Gran cantidad de micelio extrarradical. HSH intra e intercelulares.
	10	B5	<i>Exophiala tremulae</i>	Patogénica	Hojas amarillas, poca biomasa radicular. Raíces con coloración oscura	Poco material, se observaron hifas extrarradicales.
	11	G2	<i>Microdochium bolleyi</i>	Patogénica	Hojas necrosadas, poca biomasa radicular. Plantas muertas	HSO y gran cantidad de microesclerocitos intracelulares.

Diversidad y Riqueza

Para comparar la comunidad de hongos DSE en plantas E+ y plantas E- (Fig. 1.6.), se determinaron la riqueza y diversidad mediante los índices de Shannon-Wiener y Simpson, cuyos valores correspondientes pueden observarse en la **Tabla 1.2**.

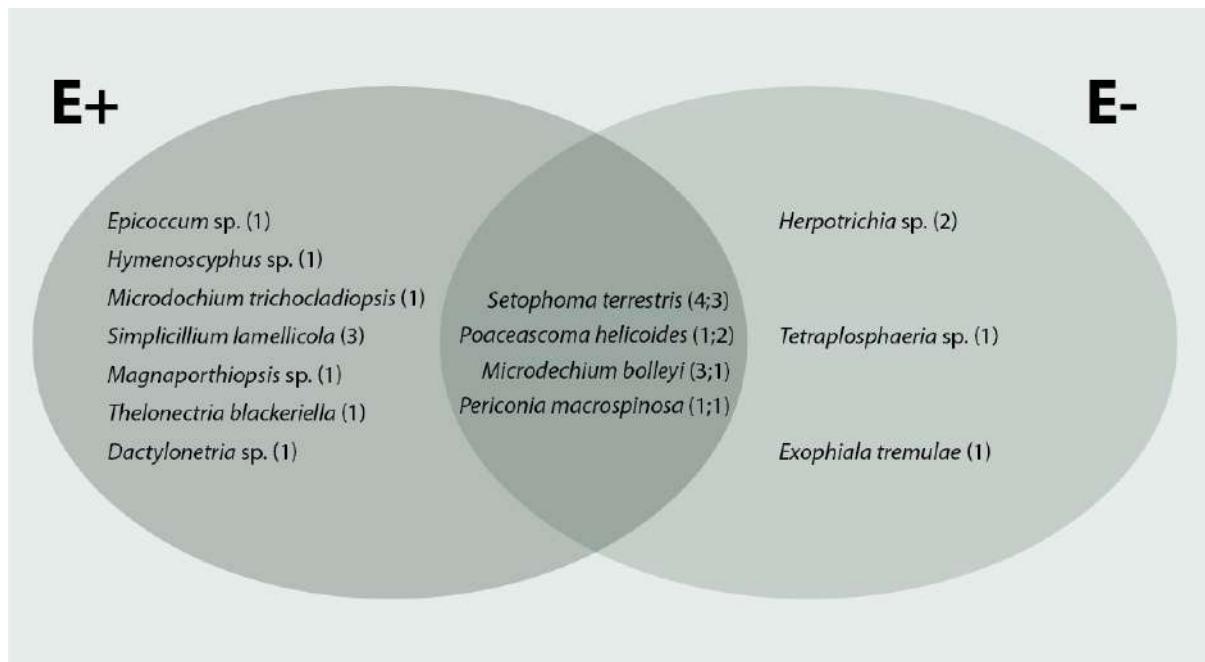


Fig 1.6. Abundancia de géneros/especies de acuerdo al estatus endofítico de las plantas de origen. Los números entre paréntesis indican el número de aislamientos por estatus.

Tabla 1.2. Riqueza, índice de Shannon y Simpson asociados a plantas E+ y E-.

	E+	E-
Riqueza (S)	11	7
Índice de Shannon - Wiener (H')	2,22	1,86
Índice de Simpson (D)	0,87	0,83

Análisis de correlación de estatus vs especies

La correlación de las variables “especies” con la variable estatus endofítico de la planta de origen de cada aislamiento muestra que no hay correlaciones significativas entre ellas (**Fig. 1.7**)

Fig. 1.7. Matriz de correlación entre variables especies y el estatus endofítico de la planta de origen. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 14 datos entre las variables: Estatus, correspondiente a la planta de origen. *Setophoma terrestris*. *Epicoccum* sp. *Herpotrichia* sp. *Periconia macrospinosa*. *Poaceascoma helicoides*. *Tetraplosphaeria* sp. *Hymenoscyphus* sp. *Microdochium bolleyi*. *Microdochium trichocladiopsis*. *Exophiala tremulae*. *Magnaportheopsis* sp. *Dactylolectria* sp. *Thelonectria blackeriella*. *Simplicillium lamellicola*. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).

Análisis multivariado

El análisis de componentes principales (PCA) permitió descomponer las correlaciones entre las variables estudiadas. Los resultados indican que la inercia total y no restringida es igual a 14, lo que sugiere que todas las variaciones fueron incluidas en el análisis. En cuanto a los valores propios (*eigenvalues*), el primer componente principal (PC1) presentó un valor de 2.9984, explicando el 21.42% de la variación total. Por su parte, el PC2, con un eigenvalue de 2.6645, explica el 19.03%. Finalmente, el PC3, con un eigenvalue de 1.5796, PC3 explica 11.28%. Por

lo tanto, los tres primeros PC explican el 51% de la variabilidad del sistema evaluado.

En relación a la contribución de las especies a cada componente principal, *Setophoma terrestris* fue la variable que más contribuyó positivamente a la PC1. También es notable la influencia negativa de *Dactylonectria* sp. y *Thelonectria blackeriella*, lo que sugiere que estas especies tienen un impacto significativo en la separación de muestras en la dirección de PC1. *Microdochium trichocladiopsis* y *Hymenoscyphus* sp. son las especies con mayor impacto en PC2, ambas con una correlación positiva significativa, seguidas de *Microdochium bolleyi* lo que indica que estas especies desempeñan un papel clave en la variabilidad explicada por esta componente. *Magnaportheopsis* sp. seguida de *Hymenoscyphus* sp. y *Microdochium trichocladiopsis* aportan de forma significativa a la PC3. Esto sugiere que estas especies son críticas para capturar la variabilidad explicada por este componente. Finalmente, se puede mencionar a la especie *Herpotrichia* sp. que resultó ser el principal contribuyente negativo.

La distribución espacial de las especies en el gráfico de PCA (**Fig. 1.8**) permite identificar cómo se agrupan o dispersan en función de sus contribuciones a las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2), sugiriendo la posible existencia de al menos tres comunidades diferenciadas. Uno de los grupos estaría conformado por especies como *Setophoma terrestris* y *Hymenoscyphus* sp. ubicadas en el cuadrante superior derecho (PC1 y PC2 positivos), que podría estar asociado a plantas E+. En el cuadrante inferior izquierdo (PC1 y PC2 negativos), especies como *Simplicillium lamellicola*, *Dactylonectria* sp., y *Thelonectria blackeriella* muestran afinidad en este espacio, lo que podría indicar una comunidad con características opuestas a las del Grupo 1, sin embargo, también asociado a plantas E+. En el cuadrante inferior derecho (PC1 positivo, PC2 negativo), se encuentran especies como *Periconia macrospinosa* y *Poaceascoma helicoides*. Estas especies parecen agruparse debido a su contribución moderada al PC1 y baja al PC2. Este grupo se encuentra asociado a plantas E+ y E-, por lo que en este caso no queda claro la existencia de alguna tendencia. Considerando patrones adicionales, especies como *Microdochium bolleyi* y *Herpotrichia* sp. están más separadas del centro, lo que sugiere que explican gran parte de la variación asociada a las componentes principales, mientras que especies, como *Tetraplosphaeria* sp. y

Exophiala tremulæ, se agrupan cerca del origen, lo que indica que tienen contribuciones más moderadas a los componentes analizados.

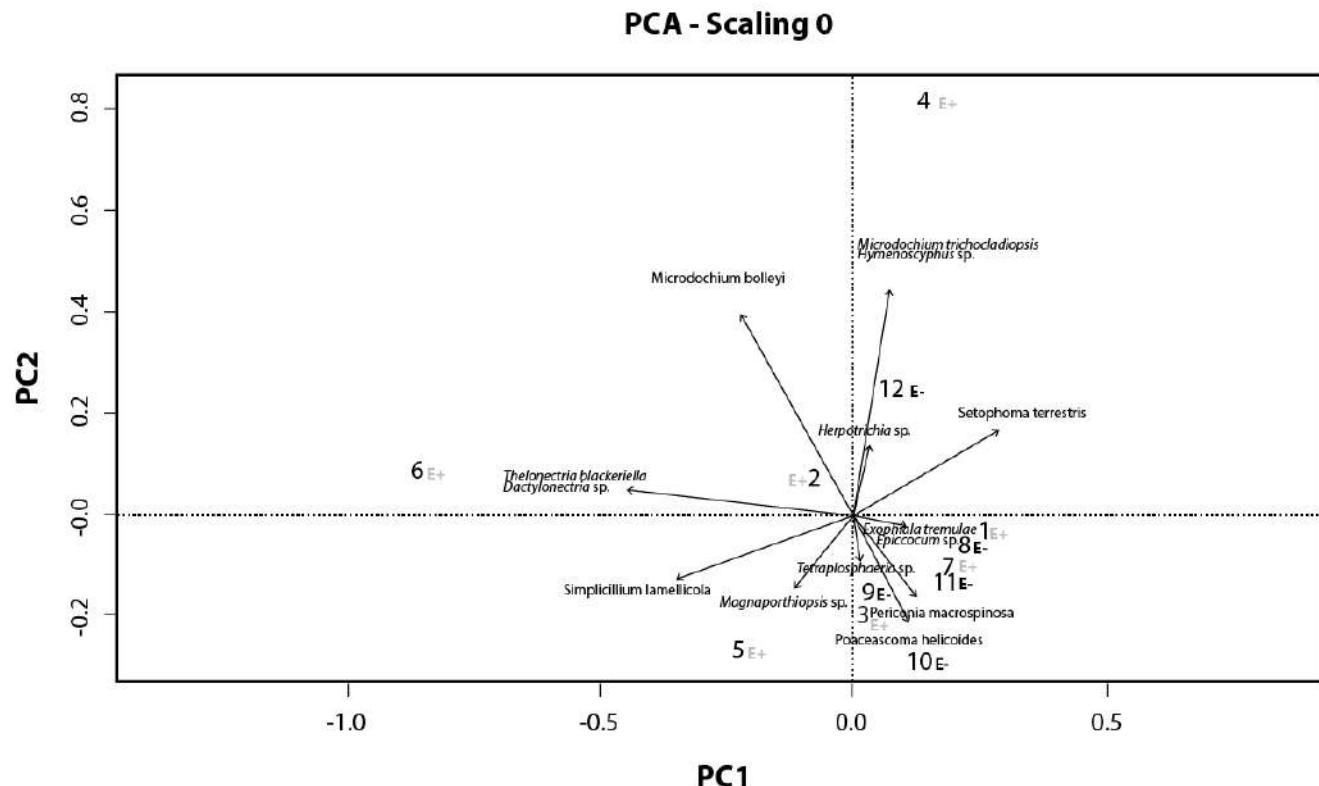


Fig 1.8. Análisis de componentes principales (PCA) realizado sobre 14 cepas de endofitos septados oscuros aislados plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) y plantas no asociadas (E-). Los números representan las muestras de plantas. Las plantas numeradas 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 corresponden a E+ y las plantas numeradas; 8; 9; 11; 12; corresponden a E-.

Se realizó una prueba de correlación de Pearson para evaluar la significancia de las correlaciones entre las variables y el estatus de la planta de origen. La matriz de p- valores muestra que las correlaciones no son estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

El estudio de las interacciones planta-microorganismo permite explorar la diversidad de estrategias nutricionales de los hongos asociados y su impacto en el hospedante. Para avanzar en esta comprensión, es fundamental evaluar experimentalmente la naturaleza de estas relaciones, ya que las condiciones ambientales y los factores del hospedante pueden influir en el comportamiento de los microorganismos. En este sentido, los ensayos *in vitro* de resíntesis constituyen una herramienta clave para validar si los hongos aislados actúan como endofitos o patógenos bajo condiciones controladas, proporcionando una base para discutir la complejidad de estas interacciones. Estos experimentos permitieron realizar observaciones preliminares para describir y entender el tipo de interacción entre planta-microorganismo en nuestro sistema acotado de estudio.

Aunque los hongos fueron aislados de plantas sanas de *Bromus auleticus* cultivadas a campo, era necesario corroborar su comportamiento endófitico.

Cepas endófiticas

En relación a las especies que mostraron sólo cepas endófiticas fueron identificadas *Microdochium trichocladiopsis*, *Magnaportheopsis* sp., *Dactylolectria* sp. y *Thelonectria blackeriella*, todas a partir de plantas E+. Por su parte, *Periconia macrospinosa* fue aislada tanto a partir de plantas E+, como de plantas E-. Respecto de *Microdochium trichocladiopsis*, antecedentes mencionan su aislamiento a partir de la rizósfera de *Triticum aestivum* (De Hoog y Hermanides-Nijhof 1977) y de raíces sanas de *Arabidopsis thaliana* (Mesnyi *et al.*, 2021). En este último caso los autores secuenciaron el genoma de los endofitos fúngicos más representativos asociados a las raíces de *A. thaliana* entre los que se encontraba *M. trichocladiopsis*, el cual estaba presente en más del 50 % de las muestras. Asimismo, se realizaron ensayos de re-inoculación y evaluación del rendimiento que revelaron que esta especie no presentó un efecto negativo o positivo para la planta, lo que respalda su comportamiento como endofito. En este estudio las plantas inoculadas con la cepa de *M. trichocladiopsis*, se presentaban sanas y en las raíces se observaron hifas septadas oscuras y microesclerocitos, confirmando la estrategia endófita de la cepa, además de la inoculación exitosa. Además, como se

mencionó, en nuestro país Rhoten *et al.*, (2018) y Echeverría *et al.*, (2024) aislaron otras especies de este género que fueron consideradas endofíticas.

En el caso de *Magnaportheopsis* sp., especies asociadas a este género han sido identificadas como fitopatógenos causantes de enfermedades de raíz en céspedes asociados a campos deportivos sembrados con *Festuca rubra* y *Poa annua* entre otros (Luo *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2022), también hay especies asociadas a la marchitez en cultivos de importancia económica como maíz y algodón (Dor y Degani 2019). En nuestro estudio, las plántulas de *B. auleticus* no presentaron síntomas de enfermedad aunque las raíces se observaron más delgadas y con coloración oscura respecto al control, a su vez se observaron hifas colonizando las raíces y la cepa inoculada logró ser reaislada, por lo tanto la inoculación resultó exitosa. Algo similar ocurrió con *Dactylolectria* sp. Gran parte de los estudios describen a las especies de este género como patógenos en leñosas frutales, como la vid y el manzano, en lo que se conoce como Síndrome del replante del manzano. Este síndrome afecta principalmente la biomasa aérea, mientras que en el sistema radicular, los síntomas incluyen una reducción significativa de la biomasa de raíz, un menor número de raíces, y la aparición de lesiones radiculares necróticas, negras y hundidas (Mancini *et al.*, 2018; Gramaje *et al.*, 2020). Sin embargo, otros estudios señalan un rol no patogénico de ciertas especies de *Dactylolectria*, en las plantas circundantes a campos de vid (Agustí-Brisach *et al.*, 2011). Además, se han logrado aislar especies de este género a partir de plantas asintomáticas, como cereales y brasicáceas (Langenhoven *et al.*, 2018), lo que sugiere que su comportamiento puede depender del contexto ecológico y del hospedante, o más aún, el hecho de que fitopatógenos se encuentren en plantas circundantes asintomáticas puede determinar una estrategia, en la que dichas plantas sirvan de reservorio del inóculo. En el ensayo se resintesis llevado a cabo en este estudio, las plantas inoculadas fueron más pequeñas que las del tratamiento control, sin embargo todas se encontraban en condiciones saludables y se observaron hifas septadas hialinas al microscopio óptico.

En relación con *Thelonectria blackeriella*, los antecedentes la mencionan tanto como endofítica como fitopatógena. Este hongo ha sido aislado de raíces de plantas sanas de ginseng, *Panax bipinnatifidus* var. *bipinnatifidus* (An *et al.*, 2022). Sin embargo, ciertas especies del género forman parte de un complejo de hongos fitopatógenos, que también incluye a especies del género *Dactylolectria*, causantes

de la podredumbre de raíz en *Panax ginseng* (Guan *et al.*, 2020). En este estudio, todas las plantas de las cuales se aisló *T. blackeriella* estaban sanas, y se observaron todas las estructuras fúngicas características de los DSE.

Como se mencionó previamente en esta sección, las tres cepas identificadas como *Magnaportheopsis* sp., *Dactylonectria* sp. y *T. blackeriella*, que en nuestro estudio han sido clasificadas como endofíticas, tienen antecedentes como patogénicas. Una posible explicación para su comportamiento como endofíticas radica en que la interacción con el hospedante depende en gran medida de las diferencias entre las especies de plantas hospedantes involucradas. En este estudio se utilizó el mismo hospedante del cual fueron aisladas, lo que podría haber favorecido una interacción menos agresiva. Además, las condiciones experimentales y la asociación de las plantas con el endofito de vástago *Epichloë*, el cual podría modular la respuesta planta-DSE, son factores que también podrían influir en esta interacción.

Finalmente se identificó *Periconia macrospinosa* con estrategia endofítica, asociada a plantas E+ y E-. Esta especie ha sido descripta por distintos autores como hongo DSE, aislado de una amplia variedad de ambientes que van desde templado a tropicales y de sistemas agrícolas a pastizales nativos (Domsch *et al.*, 1980; Ellis 1971; Mandyam *et al.*, 2010 Knapp *et al.*, 2018). Si bien hay un estudio que menciona por primera vez a esta especie como causante de mancha foliar en una cucurbitácea de importancia económica en India (Sarkar *et al.*, 2019), Yakti *et al.*, (2018) evaluaron parámetros de crecimiento en plantas de tomate, observando un aumento de la biomasa de raíces y brotes cuando los recursos de nutrientes orgánicos estaban presentes. Más aún recientemente, se ha evaluado su efecto como promotor de crecimiento en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) y su efecto antagonista ante *Fusarium oxysporum* (Sidhoum *et al.*, 2024). Estos antecedentes demuestran que el hongo se comporta como un endofito, lo que concuerda con nuestros resultados.

Cepas patogénicas

Las cepas clasificadas como patógenas debido a la presencia de lesiones en la parte aérea, en las raíces o bien ocasionar la muerte de las plántulas, incluyeron especies de *Epicoccum* e *Hymenoschyphus* ambas aisladas de plantas E+, así como una especie de *Tetraplosphaeria* y *Exophiala tremulæ* aisladas de plantas E-.

El género *Epicoccum* está asociado al *Fusarium Head Blight* (FHB), ocupando el mismo nicho que el complejo de especies del FHB en las cabezas maduras de los cereales y en el grano cosechado (Karlsson *et al.*, 2021). Mientras que, *Hymenoscyphus* es un género extenso de la familia Helotiaceae, que incluye más de 150 especies. Durante mucho tiempo se consideró que estaba integrado por descomponedores saprótrofos y endofitos no patógenos, hasta que la aparición de *H. fraxineus* como un exitoso patógeno invasor de fresnos en Europa, evidenció su capacidad patogénica causando grandes pérdidas (Rafiqui *et al.*, 2023).

En cuanto a *Tetraplosphaeria*, aunque existen pocos estudios sobre su rol como endofito, este organismo ha sido aislado a partir de caña de azúcar en etapas de producción comercial (Xiao *et al.*, 2022). Estos investigadores evaluaron la diversidad y riqueza de endofitos en dos tipos de producción de azúcar, convencional y mecanizada. Aunque no encontraron diferencias significativas en la diversidad entre ambos tipos de producción, observaron una mayor abundancia del género *Tetraplosphaeria* en la producción mecanizada, lo cual sugiere un posible efecto positivo en el crecimiento y salud de la caña de azúcar en este sistema de producción. Este hallazgo contrasta con los resultados obtenidos en la única cepa perteneciente a este género aislada en este estudio.

En el caso de *Exophiala tremulae*, existe poca información sobre esta especie en particular. El género *Exophiala* está ampliamente distribuido, y varias especies dentro de este grupo han sido identificadas como posibles agentes de micosis en humanos y animales. Sin embargo, en otros estudios, algunas especies de *Exophiala* han demostrado potencial para aplicaciones agrícolas y biotecnológicas (Thitla *et al.*, 2022). El primer registro se realizó en Canadá a partir de madera de *Populus tremuloides*, y su caracterización enzimática sugiere un posible rol saprobio (Crous *et al.*, 2011). Mientras que Macia-Vicente *et al.*, (2016) señalaron que esta especie se asocia principalmente a plantas o suelo, incluyendo suelo rizosférico. Aproximadamente el 95 % de los registros de material vegetal corresponden a raíces, en su mayoría de plantas sanas, lo cual, si bien coincide con las condiciones de aislamiento de este trabajo, ya que se utilizaron para ello plantas sanas de *B. auleticus*, contrasta con los resultados de resíntesis obtenidos en este estudio. Además, las fuentes bibliográficas (Crous *et al.*, 2011; Macia-Vicente *et al.*, 2016)) indican que su distribución es exclusiva del Hemisferio norte, recientemente

Echeverría *et al.*, (2024) han citado el aislamiento de cepas de *E. equina* y nuestro aislamiento sería el primer registro de esta especie en Argentina.

Los antecedentes mencionados indican que, en algunos casos, estas especies han mostrado un comportamiento endofítico y saprobio, aunque la mayoría de los estudios han involucrado hospedantes distintos y diversos al evaluado en este trabajo. A nivel macro y microscópico, estas especies han presentado un menor desarrollo de *B. auleticus*, presentando hojas cloróticas y al observar la colonización se detectó una gran cantidad de hifas externas. Aunque es necesario una investigación más profunda, la existencia de cepas endofíticas o patogénicas dentro de una misma especie, no es algo nuevo y ha sido estudiado más profundamente en géneros como *Verticillium* y *Fusarium*, entre los que se han descripto patógenos o endofitos dentro de un mismo hospedante o entre hospedantes distintos (Lofgren *et al.*, 2018; Wheeler *et al.*, 2019). En este caso, se ha postulado una expansión del rango de hospedantes junto con las capacidades endofíticas y patógenas que hayan facilitado la infección y el flujo genético entre poblaciones sintomáticas y asintomáticas de hospedantes a pesar de presentar una diferenciación menor (Wheeler *et al.*, 2019). Sin embargo, la capacidad de los hospedantes para albergar infecciones asintomáticas, la estabilidad de estas infecciones a lo largo del tiempo y los mecanismos involucrados en el mantenimiento del endofitismo y la patogénesis, son aspectos que aún quedan por dilucidar.

Rol dual de las cepas DSE: endofítico y patogénico en sistemas planta-microorganismo

Los resultados de las pruebas de resíntesis revelaron que algunas cepas mostraron un comportamiento patogénico y otras endofítico, incluso dentro de la misma especie. De esta manera se detectaron cepas con estrategias nutricionales divergentes en *Setophoma terrestris*, *Poaceascoma helicoides*, *Microdochium bolleyi*, *Simplicillium lamellicola* y *Herpotrichia* sp. De las 5 especies que presentaron ambas estrategias nutricionales, en la mayoría se observó una menor biomasa radicular en cepas con comportamiento patogénico en comparación con las plantas asociadas a cepas endofíticas. A su vez las observaciones de las raíces teñidas al microscopio, permitieron detectar que en todos los casos había una gran cantidad de hifas externas rodeando las raíces, por lo que estas cepas podrían, además, haberse comportado como saprobias. En este estudio, se identificaron 7

cepas de *S. terrestris*, 4 aisladas de plantas E+ y 3 de plantas E-. Además, según los resultados del ensayo de resíntesis, 5 cepas mostraron un comportamiento patogénico y 2 fueron clasificadas como endofíticas.

S. terrestris es conocido como el agente causal de la enfermedad de la podredumbre rosada de la raíz en cebollas y del enrojecimiento o podredumbre rosada de la raíz en diversos hospedantes de importancia económica como sandías y melones (Bruton *et al.*, 1997), maíz (Campbell *et al.*, 1991; Koenning *et al.*, 2007), calabazas (Ikeda *et al.*, 2012) y plantas de colza (Yang *et al.*, 2017). Esta enfermedad, típica de climas cálidos y severa en sistemas de monocultivo, produce síntomas característicos primarios como la coloración rosado pálido en las puntas de las raíces y en los puntos de ramificación de las raíces, seguido de un marchitamiento de las raíces con decoloración de rojo a púrpura intenso (Yoshida *et al.*, 2022). Estos síntomas coinciden con los observados en las plántulas de *B. auleticus*, las cuales permitieron determinar la patogenicidad de las cepas, incluso observando podredumbre basal. Sin embargo, en otros estudios *S. terrestris* ha sido aislada como hongo endofítico de kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) (Poveda *et al.*, 2022), plantas leñosas (Knapp *et al.*, 2012) y plantas de ginseng (Park *et al.*, 2012). Poveda *et al.*, (2022) llevaron a cabo ensayos con hongos endofíticos, entre ellos *S. terrestris*, y hongos patógenos, con el fin de estudiar cómo afectan los glucosinolatos (GSL) a la colonización de cepas con distintas estrategias nutricionales. Los GSL son metabolitos secundarios presentes en la familia *Brassicaceae*, los cuales confieren resistencia a la planta frente a estrés biótico y abiótico. Además, realizaron ensayos de crecimiento en seis especies de *Brassica* y evaluaron la actividad enzimática de *S. terrestris*. Los autores observaron que, al día 7 de la inoculación, *S. terrestris* mostró una colonización significativamente mayor en comparación con las demás cepas, tendencia que se atenuó para el día 17, momento en el que no se encontraron diferencias significativas entre las cepas endofíticas. Las cepas patógenas, en cambio, presentaron una colonización menor, posiblemente debido a la producción de GSL, ya que los perfiles de concentración de estos compuestos fueron mayores en plantas inoculadas con cepas patogénicas. En cuanto a los efectos sobre el crecimiento de las plantas, *S. terrestris* mostró actividad promotora del crecimiento, especialmente en *B. nigra* y *B. carinata* (Poveda *et al.*, 2022). Sin embargo, en *B. napus*, la inoculación de las raíces resultó en una reducción del crecimiento, lo cual es congruente con lo informado por Yang

et al., (2017), quienes documentaron el primer caso de podredumbre rosada de la raíz en *B. napus* causada por *S. terrestris*. Finalmente, los análisis *in vitro* demostraron por primera vez en esta especie la capacidad de *S. terrestris* para solubilizar fósforo, además de su actividad xilanasa y amilasa.

Continuando con las cepas identificadas en este estudio, *Poaceascoma helicoides* presentó una cepa con comportamiento endofítico aislada a partir de plantas E+ y dos cepas patogénicas provenientes de plantas E-. Las cepas patogénicas causaron una reducción de la biomasa radicular en comparación a las plantas inoculadas con la cepa endofítica. Resulta interesante mencionar, que la estrategia nutricional de *P. helicoides* parece estar influenciada por la presencia o ausencia de *Epichloë*, lo que sugiere una interacción compleja entre estos microorganismos y su hospedante. La investigación sobre *P. helicoides* es relativamente limitada pero ofrece perspectivas interesantes. Algunos estudios la describen como una especie saprobia en tallos y raíces de gramíneas (Pookamsak *et al.*, 2015), mientras que otros la identifican como un hongo endofítico aislado a partir de distintas especies de plantas herbáceas (Goodarzian *et al.*, 2021), de caña de azúcar en Brasil (Fors *et al.*, 2020) y de *Phragmites australis* en China (Minghui *et al.*, 2024). En este último caso, no sólo se aisló el hongo, sino que se caracterizó como resistente al Cadmio (Cd), y capaz de aumentar su biomasa con incrementos en los niveles del metal pesado, lo que sugiere su potencial uso como agente biorremediador (Minghui *et al.*, 2024).

En lo que respecta a *Microdochium* se sabe que varias especies del género presentan comportamientos patógenos o endofíticos. En particular, *M. bolleyi* ha sido ampliamente investigada por sus propiedades endofíticas en gramíneas y cereales. En este estudio se han aislado 4 cepas, 2 de ellas endofíticas y 2 patogénicas, independientemente del estatus de *Epichloë*. En Argentina, *M. bolleyi* fue aislado como endofito a partir de raíces de trigo (Rothen *et al.*, 2018), y otra especie del mismo género, *Microdochium* sp., que fue aislada a partir de cebada, mostró capacidad para solubilizar diferentes fuentes de P inorgánico *in vitro* (Echeverría *et al.*, 2024). Por su parte, Mandyam *et al.*, (2010) informaron de resultados positivos tras la inoculación de esta especie en *Adropogon gerardii*. Sin embargo, también se han observado hallazgos contrastantes. Algunas investigaciones han identificado formas patógenas de *M. bolleyi* aisladas de plantas

enfermas, las cuales son responsables de la podredumbre de raíz y corona demostrando una alta virulencia, particularmente en gramíneas (Ünal, 2024).

Siguiendo la lista de especies con estrategias nutricionales contrastantes obtenidas en este estudio, en el caso de *Simplicillium lamellicola* se identificaron tres cepas asociadas a plantas E+, de las cuales dos fueron endofíticas y una patogénica. Las especies del género *Simplicillium* tienen una amplia distribución y son reconocidas por su versatilidad ecológica, actuando como parásitos de mamíferos y plantas, simbiontes, entomopatógenos y nematófagos, dado su amplio espectro de hospedantes y sustratos (Wei *et al.*, 2019). Además, investigaciones recientes han sugerido potenciales beneficios. Abaya *et al.*, (2021) demostraron que *S. lamellicola* aumentó el crecimiento durante la fase de plántula y actuó como un prometedor agente de control biológico, reduciendo eficazmente la enfermedad FHB en plantas de *Triticum aestivum*.

Finalmente, las dos cepas de *Herpotrichia* sp. que fueron aisladas de plantas E-, también mostraron estrategias opuestas. Los estudios encontrados, asocian una especie de *Herpotrichia* con plántulas enfermas de pino siberiano en viveros forestales en Siberia Central (Sheller *et al.*, 2020), mientras que a otras especies del género, con una enfermedad de plántulas en coníferas que provoca oscurecimiento en las acículas (Kowalski *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2009). Sin embargo no hay registros de esta especie, como endofítica o asociada a gramíneas, por lo que este estudio sería el primer registro.

Estos resultados son consistentes con el concepto del continuo mutualismo-parasitismo, donde la naturaleza de la interacción fluctúa a lo largo de un espectro en función de factores como el ambiente y la disponibilidad de recursos (Schulz y Boyle, 2005; Mandyam y Jumpponen, 2015).

Cabe destacar que entre las cepas aisladas originalmente como endofíticas, algunas adoptaron un comportamiento patogénico en condiciones controladas, sugiriendo que el ambiente experimental pudo influir en su interacción. Sin embargo, no se descarta que, bajo condiciones más cercanas a las de su entorno natural, estas mismas cepas puedan ejercer un efecto beneficioso para la planta. Esto es consistente con las observaciones de Junker *et al.*, (2012), quienes reportaron un aumento de los síntomas negativos de endofitos foliares, usualmente asintomáticos, cuando estos fueron reinoculados en su hospedante de origen bajo condiciones de cultivo axénico.

Por otra parte, los resultados del metanálisis de Newsham (2011) permitieron establecer que los efectos positivos asociados a los DSE, como el incremento en la biomasa vegetal, se observaron cuando la inoculación se realizó en un sistema sin nitrógeno (N) inorgánico adicional o cuando la mayor parte del N se había suministrado en formas orgánicas. En nuestro sistema, se utilizaron como fuentes de N dos formas inorgánicas, nitrato de potasio y nitrato de calcio, incluidas en la solución de riego. Esto podría haber favorecido la respuesta patogénica por parte de ciertas cepas. Sin embargo se requerirán estudios adicionales para establecer con mayor precisión el papel diferencial de las fuentes orgánicas e inorgánicas sobre el comportamiento de cada cepa en particular.

Nuestros resultados son coherentes con antecedentes que demuestran que una misma cepa puede tener efectos opuestos dependiendo del hospedante (Reininger *et al.*, 2012) o incluso efectos opuestos dependiendo de la identidad de la cepa en un mismo hospedante (Li *et al.*, 2018). Un ejemplo interesante que respalda lo mencionado anteriormente es el estudio de Mandyam *et al.*, (2010), en el que se evaluaron dos cepas fúngicas: *Periconia macrospinosa*, también identificada en esta tesis, y *Microdochium* sp., un género presente en este trabajo. Los autores aislaron estos hongos endofíticos a partir de pastizales altos de la pradera en Kansas, Estados Unidos y realizaron ensayos de resíntesis en puerro, un hospedante distinto al hospedante de origen, en el que también evaluaron los efectos sobre su biomasa, lo mismo que en la gramínea *Andropogon gerardii*. Los resultados mostraron que el crecimiento del puerro no manifestó una respuesta significativa a la inoculación con *P. macrospinosa* o *Microdochium* sp., mientras que *A. gerardii* tendió a responder positivamente a la presencia de ambos. Por su parte, Mandyam *et al.*, (2012) utilizando combinaciones de plantas hospedantes y hongos DSE nativos de praderas de pastos altos en estudios de resíntesis junto con datos de colonización de DSE en el campo, confirmaron el amplio rango de hospedantes de los hongos DSE, sugiriendo que las gramíneas pueden ser más fuertemente colonizadas por DSE y más sensibles a la colonización de DSE que herbáceas dicotiledóneas y que la simbiosis cae dentro de un rango a lo largo del continuo mutualismo-parasitismo. Por su parte, Collinge *et al.*, (2022) mencionan que algunos patógenos pueden adoptar temporalmente un estilo de vida endofítico en sus plantas hospedantes. Sin embargo, estos no deben considerarse verdaderos endofitos, ya que tienen el potencial de causar enfermedades cuando las condiciones son favorables. En

contraste, el mismo organismo puede actuar como un verdadero endofito en una planta no hospedante, en la cual no provoca enfermedad. Esto subraya que la capacidad de causar daño depende del contexto ecológico y del tipo de interacción específica entre el microorganismo y la planta.

Los hábitos tróficos de los hongos están asociados con la presencia o ausencia de genes involucrados en la degradación de los componentes de la pared celular de las plantas. Los análisis filogenéticos han proporcionado evidencia de modificaciones genómicas en ciertos hongos simbiontes de las raíces con el fin de cambiar de estilos de vida saprotróficos/patógenos a estilos de vida simbióticos (Kohler *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2016). Se ha documentado una pérdida convergente de rasgos saprotróficos, como los genes que codifican enzimas que degradan la pared celular de las plantas por ejemplo, en hongos ectomicorrícos (Kohler *et al.*, 2015). Las estructuras de interfaz se han considerado las características definitorias de las interacciones entre raíces y hongos, sin embargo, los mecanismos subyacentes del intercambio de nutrientes varían entre las diferentes asociaciones y se considera que el tipo de interacción planta-hongo en el espectro mutualismo-parasitismo depende en última instancia del equilibrio nutricional alcanzado por la asociación más que del tipo de estructura de interfaz que se forma (Smith, 1996). Independientemente del tipo de simbiosis y de los rasgos morfológicos, el resultado neto de las interacciones raíz-hongo para las plantas hospedantes (respuestas positivas, neutrales o negativas) está determinado por las condiciones ambientales (p. ej., disponibilidad de nutrientes en el suelo), la genética planta/hongo y las relaciones temporales durante el desarrollo micorrízico (Johnson, Graham y Smith, 1997). Las simbiosis entre raíces y hongos, como los hongos micorrílicos arbusculares y los endofitos, son componentes clave de los ecosistemas terrestres. Estas asociaciones, que presentan una gran diversidad en cuanto a sus estrategias tróficas (obligados, facultativos o hemibiotrofos) y relaciones simbióticas (desde mutualismo hasta parasitismo), también muestran una gran variabilidad en sus estrategias de colonización de raíces y nutrición. Ciertas asociaciones forman estructuras de interfaz especializadas, como arbúsculos y redes de Hartig, mientras que otras se limitan a hifas intracelulares o intercelulares no especializadas en las raíces (Kariman *et al.*, 2018). En comparación con las simbiosis micorrílicas más conocidas o los endofitos foliares sistémicos transmitidos verticalmente, los

endofitos fúngicos asociados a las raíces han recibido poca atención (Rodríguez *et al.*, 2009). A raíz de ello, quedan por comprobar muchos factores que potencialmente influyen en estas simbiosis (Mandyam y Jumpponen, 2015). Los esfuerzos por explicar de manera indiscutible y profunda la simbiosis con los hongos DSE han sido una constante, pero las respuestas de los hospedantes a los hongos DSE son consideradas, en líneas generales, inciertas y actualmente están en debate (Santos *et al.*, 2021). Dos de los metanálisis más recientes con los que se cuenta, han producido resultados contradictorios. Alberton *et al.*, (2010) concluyeron que, si bien las respuestas del crecimiento del hospedante eran variables, tendían a ser en promedio negativas, sin embargo Newsham (2011) con un análisis más amplio y detallado encontró que la inoculación con DSE aumentó la biomasa del hospedante. En el estudio de las interacciones, las moléculas efectoras desempeñan un papel interesante en la comunicación planta-microorganismo, Constantin *et al.*, (2021) han identificado homólogos de efectores patogénicos en cepas endofíticas de *Fusarium oxysporum*. Aunque estas cepas endofíticas suelen presentar un menor número de efectores, este hallazgo sugiere que las cepas endofíticas mantienen una capacidad limitada para influir en la fisiología de la planta, lo que podría estar relacionado con su menor virulencia comparada con las cepas patógenas. Estos estudios evidencian que las interacciones entre endofitos y plantas dependen no solo de la especie de microorganismo involucrado, sino también de la identidad del hospedante y de las condiciones abióticas. Esto subraya la complejidad y especificidad de las relaciones simbióticas, donde los mismos endofitos pueden tener efectos variables dependiendo del contexto ecológico y fisiológico en el que se desarrolla la planta.

La identificación de cepas DSE aisladas de plantas sanas de *B. auleticus*, tanto asociadas como no asociadas a *Epichloë*, ha revelado por primera vez la presencia de cepas de hongos asociados a esta especie forrajera nativa. El ensayo de resíntesis permitió profundizar en la comprensión del papel de cada cepa, destacando su comportamiento dentro del continuo mutualismo-parasitismo. Estos resultados deben interpretarse teniendo en cuenta el hospedante específico con el que trabajamos, así como las condiciones ambientales del medio, que pueden influir en la expresión de las interacciones entre las cepas y la planta.

Diversidad

Al analizar la riqueza y diversidad de los DSE asociados a *B. auleticus*, se observó que estas varían en función de la interacción del hospedante con *Epichloë*. Las plantas E+ mostraron una mayor riqueza, con 11 especies en comparación con las 7 observadas en las plantas E-, lo que indica una mayor tendencia a la diversidad de hongos en las plantas asociadas a *Epichloë*. Esta tendencia también se reflejó en el índice de Shannon, que fue 19.35% superior en las plantas E+, en comparación con las E-, lo que sugiere una mayor equidad y diversidad dentro de la comunidad de hongos. El índice de Simpson, aunque sólo fue ligeramente mayor (4.82%) en las plantas E+, respalda esta mayor diversidad en las plantas asociadas a *Epichloë*. Estudios previos muestran resultados diversos con diferentes microorganismos. Arrieta *et al.*, (2015) analizaron la diversidad de hongos saprobios solubilizadores de fósforo, en suelos sometidos o no a prácticas agronómicas, asociados a *B. auleticus* infectada o no con *Epichloë pampeana*. En ambos tipos de suelos observaron que la diversidad fúngica fue mayor en suelos asociados a *Epichloë*, lo que sugiere que esta asociación influye positivamente en la diversidad microbiana del entorno. Por su parte, Vignale *et al.*, (2023) obtuvieron resultados contrastantes cuando evaluaron la diversidad de HMA en plantas *B. auleticus* con los ecotipos El Palmar (EP) y La Pampa (LP), asociadas a *Epichloë*. Los análisis de diversidad alfa y beta revelaron diferencias significativas en la riqueza y composición de HMA entre los ecotipos. Sin embargo, no se observaron diferencias en las comunidades de HMA del suelo atribuibles a *Epichloë*. Mientras tanto Garces *et al.*, (2022) realizaron un trabajo a campo para evaluar la composición de DSE asociados a plantas de *Ammophila breviligulata* E+ y E-, enriquecidas o no con una fuente de nitrógeno. Los resultados revelaron que *Epichloë* aumentó la riqueza de endofitos radiculares en *A. breviligulata* en un 17% pero sólo cambió la composición de la comunidad de endofitos radiculares en condiciones enriquecidas con nitrógeno. Otro estudio analizó la composición de hongos en semillas de *Puccinellia distans* asociadas o no a *Epichloë typhina*, mostrando que la abundancia y riqueza fue mayor en semillas E-, sugiriendo un rol protector de *E. typhina* al limitar la colonización de hongos presentes en las semillas, la mayoría de los cuales fueron identificados como patógenos o saprótrofos latentes en gramíneas (Górzyńska *et al.*, 2017). En relación

con los endofitos foliares no clavicipitaceos, un estudio comparó la comunidad de hongos endofíticos cultivables en hojas de plantas de *Poa bonariensis* E+ y E-, recolectadas de una población dioica (Mc Cargo *et al.*, 2020). Aunque no se encontraron diferencias significativas en la riqueza ni en la diversidad de endofitos entre plantas E+ y E-, ni entre plantas pistiladas y estaminadas, los resultados sugieren que *Epichloë* y el sexo de la planta hospedante podrían modular algunos de los taxones dominantes de hongos endofíticos foliares.

Estos resultados, junto con estudios previos, sugieren que *Epichloë* desempeña un papel modulador en la comunidad microbiana asociada a las plantas. En general promueve una mayor riqueza y diversidad de hongos endofíticos en plantas E+, aunque su influencia parece depender de factores como el ambiente y la disponibilidad de recursos. Por ejemplo, en suelos sometidos a prácticas agronómicas o bajo diferentes fuentes de nitrógeno, *Epichloë* favorece la diversidad fúngica. Sin embargo, en otros contextos, como en semillas de *Puccinellia distans*, limita la colonización de ciertos hongos, posiblemente como un mecanismo protector. Esto sugiere que el impacto de *Epichloë* no se restringe a efectos directos sobre la planta hospedante, sino también en la microbiota asociada, modulando su composición y potencialmente favoreciendo interacciones beneficiosas para la planta en función de las condiciones ambientales y de los recursos disponibles.

Los resultados del análisis multivariado revelaron que la distribución y asociación de las cepas fúngicas varían significativamente entre plantas. Algunas especies, como *Setophoma terrestris*, *Hymenoscyphus* sp., *Simplicillium lamellicola*, *Dactylonectria* sp. y *Thelonectria blackeriella*, mostraron una posible relación con el estatus endofítico del hospedante. Sin embargo, esta asociación no fue concluyente. Estos hallazgos resaltan la complejidad de las interacciones entre estos hongos y sus hospedantes, y sugieren que la estrategia de colonización podría estar influida por factores adicionales, como las condiciones ambientales o características específicas de cada planta.

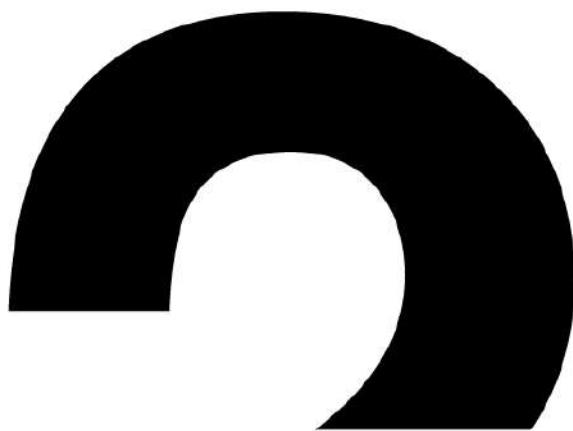
Este es el primer trabajo que identifica y analiza la diversidad de hongos DSE asociados a *B. auleticus*, en particular en asociación o no con *E. platensis*. Los géneros más representados fueron *Setophoma* y *Microdochium* con 7 y 5 cepas, respectivamente. *Setophoma* sólo representado por *S. terrestris* y *Microdochium* con

4 cepas de *M. bolleyi* y una de *M. trichocladiopsis*. Además se realizó un estudio de la respuesta del hospedante en un sistema cerrado, en condiciones controladas, que permitieron brindar un panorama de las diversas estrategias nutricionales que pueden adquirir las especies halladas, muchas de ellas no descriptas como DSE en Argentina. Especies como *M. bolleyi*, *S. terrestris*, *P. helicoides* y *S. lamellicola* fueron las más frecuentes y si bien no se encontró una tendencia significativa, la presencia de *E. platensis* marcó una mayor riqueza y diversidad de hongos DSE, particularmente con estrategia endofítica.

En conjunto, estos resultados, obtenidos a partir de cepas autóctonas, proporcionan una base sólida para estudios posteriores plasmados en los próximos capítulos. Subrayando que cada especie tiene un rol clave en la variabilidad de la comunidad fúngica, y que la presencia o abundancia de ciertas especies puede ser un indicador importante de condiciones ecológicas específicas o de relaciones con el hospedante. Estos hallazgos resaltan la importancia de ciertos hongos en la composición de la comunidad y sugieren que la interacción con el hospedante y con otras especies endofíticas, como *Epichloë*, es compleja y probablemente dependiente de múltiples factores ambientales y biológicos.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Las especies *Setophoma terrestris*, *Microdochium bolleyi*, *Microdochium trichocladiopsis*, *Poaceascoma helicoides*, *Epicoccum* sp., *Hymenoscyphus* sp., *Simplicillium lamellicola*, *Magnaportheopsis* sp., *Thelonectria blackeriella*, *Periconia macrospinosa*, *Dactylonectria* sp., *Herpotrichia* sp., *Tetraplosphaeria* sp., *Exophiala tremulae* se asocian como DSE a plantas de *Bromus auleticus*.
- Las cepas de DSE aisladas de *Bromus auleticus* presentan diferente estrategia nutricional, endofítica o patogénica, incluso entre cepas de la misma especie.
- Las plantas de *B. auleticus* asociadas a *Epichloë* presentaron mayor diversidad y riqueza que las plantas E-.
- La presencia de *Epichloë* favorecería la asociación del hospedante con cepas endofíticas.



Caracterización de las cepas de los DSE.
Interacción con endofitos *Epichloë*



Capítulo

INTRODUCCIÓN

Dado que los endofitos DSE son comunes en las raíces de diversas plantas en muchos entornos, es esperable que interactúen con otros microorganismos en simbiosis con el hospedante. Los DSE han sido aislados de plantas asociadas a hongos micorrílicos arbusculares (HMA), ericoides, orquidoides o ectomicorrílicos (Jumpponen y Trappe, 1998; Mandyam y Jumpponen, 2005), además de gramíneas en asociación con endofitos *Epichloë* (Terlizzi *et al.*, 2022). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado casi exclusivamente en un organismo específico y su impacto en el crecimiento de la planta y la protección frente a diferentes estreses (Santos *et al.*, 2021). Pocos estudios han hecho énfasis en las posibles interacciones entre DSE y otros hongos que habitan el mismo hospedante (Reininger *et al.*, 2012; Reininger y Sieber, 2012; Della Monica *et al.*, 2015), principalmente hongos micorrílicos. Los resultados de estos trabajos han demostrado efectos que van desde inhibidores hasta sinérgicos y han revelado distintos potenciales de los DSE para mejorar y promover el crecimiento de las plantas (Cano y Bago, 2005; Fryar *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2012; Terlizzi *et al.*, 2022).

A partir de lo expuesto se desprende que, además de analizar caracteres de interés en los microorganismos, es necesario estudiar cada modelo biológico antes de poder concluir cuál será el resultado neto de todas las interacciones. Desde la perspectiva de usar inoculantes de DSE como promotores del crecimiento de plantas o como agentes de biocontrol, es importante seleccionar cepas adecuadas que no se vean afectadas por otros simbiontes de las raíces o de vástago, que sean competitivas frente a ellos, sin ocasionarles perjuicios cuando se trate de simbiontes que otorguen beneficios de interés a las plantas. Por lo tanto, en la búsqueda de consorcios fúngicos adecuados para la mejora y protección de la biomasa vegetal, es necesario evaluar el tipo de relaciones, que pueden ser desde sinérgicas a antagónicas y establecer los factores que operan sobre ella.

Entre los caracteres que resultan beneficiosos para el desarrollo del hospedante, la capacidad para solubilizar fósforo (P) es uno de gran interés. Como se mencionó en la introducción general, la biodisponibilidad de fertilizantes de P en el suelo es disminuida por la adsorción a partículas del suelo (“fijación”). Como consecuencia de

ello, la aplicación de fertilizantes en concentraciones mayores a la cantidad requerida por el cultivo es empleada para contrarrestar la fuerte unión de los fosfatos a la matriz del suelo (MacDonald *et al.*, 2011). Esto puede traer consecuencias ambientales debido a que, incluso en pequeñas cantidades el P filtrado a cuerpos de agua, puede causar floraciones algales (Elser y Bennett, 2011).

Los microorganismos son uno de los componentes clave tanto de los suelos naturales como de los cultivados, afectando su calidad y la productividad de las plantas (van der Heijden *et al.*, 2008). Muchos juegan un rol fundamental en el ciclo biogeoquímico del P, afectando su biodisponibilidad (Khan *et al.*, 2010). Existen hongos y bacterias capaces de solubilizar P a partir de aquellas formas no disponibles que se encuentran en la rizósfera. Se considera que los hongos son más eficientes que las bacterias para su manejo en la solubilización de P, principalmente debido a que la forma de crecimiento miceliano de los hongos, les permite a éstos cubrir áreas de colonización más amplias que las bacterias (Kucey, 1983). Sumado a esto, en general, los hongos solubilizadores de fosfato (HSF) producen más ácidos, el principal mecanismo de solubilización y, en consecuencia, exhiben una mayor eficiencia que las bacterias al ser empleados *in vitro*, tanto en medios líquidos como sólidos (Venkateswarlu *et al.*, 1984).

En Argentina se han realizado diversos estudios *in vitro* y en macetas utilizando HSF. Scervino *et al.*, (2010) detectaron diferencias en la secreción de ácidos orgánicos en especies de *Penicillium* y *Talaromyces* al agregar distintas sales de fósforo. En otros estudios, se registró que en *P. purpurogenum* y en *T. flavus* la solubilización de P varía según las fuentes de carbono y nitrógeno suplementadas al medio de cultivo (Scervino *et al.*, 2011; Stefanoni Rubio *et al.*, 2016). Además, según Della Mónica *et al.*, (2014), la cepa de *T. flavus* afectó el estado pre-infectivo de HMA, así como también mejoró el rendimiento de plantas trigo en interacción con dichos hongos.

Los DSE como solubilizadores de Fósforo

Principales resultados a nivel mundial

Los estudios sobre la capacidad de solubilizar P por parte de los DSE son aún más escasos. Como se mencionó en la introducción general, un trabajo pionero es el de Barrow y Osuna (2002). En este trabajo los investigadores describieron una cepa de *Aspergillus ustus* asociada a las raíces de *Atriplex canescens* una planta de

importancia ecológica en los pastizales áridos del suroeste de EE. UU. que suele ser colonizada en mayor proporción por hongos DSE que por HMA. La inoculación de la cepa mencionada mostró que cuando se suministró fuentes de P no disponibles para la planta, como fosfato de roca o fosfato tricálcico [TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], el hongo colonizó las raíces permitiendo el acceso a esas fuentes incrementando la biomasa aérea y radicular y la eficiencia en el uso de fósforo. Posteriormente, estos mismos investigadores, mediante un sistema dual de cultivo demostraron que *A. ustus* solubilizó, transfirió y transportó P a partir de roca fosfórica y de TCP, lo que determinó aumentos en el número y longitud de ramificaciones en raíces transformadas (Ri-T-DNA) de *D. carota* (Osuna y Barrow, 2009). Santos *et al.*, (2013) relacionaron la mayor solubilización de fósforo a nivel rizosférico, con la microbiota endofítica presente en diversos cultivos de Brasil, particularmente con la alta proporción de DSE. En trabajos con *Phialocephala turiciensis*, *Acephala applanata*, *P. glacialis* y *Phaeomollisia piceae*, Della Mónica *et al.*, (2015) establecieron que existiría una estrecha relación entre DSE y HMA en cuanto a la disponibilidad y absorción de P en las plantas al comparar los efectos de la co-inoculación de *Trifolium repens* en presencia de fuentes orgánicas e inorgánicas de P. Estos investigadores determinaron que los DSE aumentaron la reserva de P en el suelo, que la absorción de P por las plantas aumentó con los HMA y que los DSE fueron más eficientes en la mineralización del P orgánico, independientemente de la presencia de HMA. Estas observaciones y el hecho de que el contenido de P de las plantas aumentó con la coinoculación de los hongos, les permitieron llegar a la conclusión de que mientras los DSE aumentan la reserva de P en la rizósfera, los HMA transfieren el P a la planta hospedante. Por su parte, Surono y Narisawa (2017) encontraron que *P. fortinii* tiene un papel en la promoción del crecimiento de *A. officinalis* sobre todo debido al aprovechamiento de fuentes orgánicas tanto de P como de N en el suelo.

Más recientemente, Xu *et al.*, (2020) en ensayos en maceta y utilizando un sistema compartimentalizado estudiaron los efectos de un DSE identificado como *Exophiala pisciphila* en plantas de maíz. Este hongo indujo aumentos de la biomasa, la absorción de P y la fotosíntesis al disminuir el pH de la rizósfera. Al analizar el patrón transcripcional del maíz observaron que la presencia del hongo modificaba las rutas de ocho vías metabólicas. Sin embargo, el principal mecanismo involucrado fue la solubilización de TCP en la rizósfera. Por su parte, Luo *et al.*, (2023) seleccionaron tres cepas de hongos DSE solubilizadoras de P de los géneros *Thozetella*, *Pezicula* y

Hyaloscyphaceae con el objetivo de determinar el impacto de la inoculación simple, doble o triple de DSE sobre plantas de arándano. Estos autores demostraron incrementos significativos en la biomasa de las plántulas, el contenido de nutrientes en las plantas y en el suelo, así como un aumento significativo de fósforo disponibles y de fosfatasa ácida. Por último, Bi *et al.*, (2024) utilizaron pulsos del isótopo de carbono (^{13}C) para cuantificar la distribución de C de las plantas en respuesta a diferentes hongos DSE. Sus resultados indicaron un equilibrio fuente-sumidero entre la asignación de C de las plantas y la contribución de P de los hongos, estableciendo que, en general, los hongos DSE y los HMA confirieron una mayor recompensa a las plantas con niveles bajos de P a través de estrategias sinérgicas funcionales.

DSE solubilizadores de P en Argentina

En nuestro país los estudios con cepas de DSE autóctonas son escasos. En diferentes estudios de diversidad que evaluaron la capacidad de los aislamientos para solubilizar fosfatos, esta actividad no mostró ser de las más comunes entre los hongos DSE. Rothen (2015) evaluó numerosas cepas aisladas a partir de cultivos de trigo (*Triticum aestivum*) y soja (*Glycine max*) de la provincia de Buenos Aires y ninguna de ellas mostró actividad solubilizadora. De manera similar, cepas aisladas de *Puccinellia frígida* asociada a lagunas de alta montaña de la provincia de La Rioja tampoco mostraron dicha capacidad (Cisneros *et al.*, 2014). Uno de los primeros estudios que describió la capacidad solubilizadora de cepas autóctonas *in vitro*, incluyó hongos DSE aislados de raíces de *Triticum aestivum* y de las forrajeras *Panicum coloratura* y *Chloris gayana* (Spagnoletti *et al.*, 2017). Varias cepas mostraron solubilización en medio sólido, destacándose en la solubilización de TCP aquellas identificadas como *Ophiophaerella* sp. y *Cochliobolus* sp., seguidas por *Setosphaeria rostrata*. En contraste, cepas de *Drechslera* sp., y de *Ophiophaerella herpotricha*, lograron solubilizar fosfato de aluminio [FA, AlPO_4]. En medio líquido, los aislamientos mostraron diferentes capacidades para generar acidez y solubilizar fosfatos. Una cepa de *Drechslera* sp., resultó ser la más eficiente en solubilizar TCP, mientras que una de *Curvularia* sp. se destacó en la solubilización de FA y otra de *Ophiophaerella* sp. en la de fosfato ferroso [FF, FePO_4]. En uno de los primeros estudios en los que se incluyó el efecto sobre las plantas, se evaluó una cepa del género *Curvularia* en su capacidad de influir en las fracciones insolubles de fósforo inorgánico (Pi) en un ensayo en maceta con sorgo (Barresi *et al.*, 2022). Aunque no

se observaron estructuras fúngicas en las raíces ni cambios en la fracción de Pi, se registraron incrementos en la biomasa de vástago y en la longitud de raíz, efectos que podrían atribuirse a una actividad saprofítica de la cepa. A pesar de que los resultados no fueron concluyentes, muestran la potencialidad de ese modelo.

Por otra parte, recientemente Echeverría *et al.*, (2024) aislaron diversas cepas endofíticas de raíces de cebada (*Hordeum vulgare*), entre ellas algunas identificadas como DSE. Todas las cepas mostraron algún grado de solubilización de alguna fuente inorgánica de P tanto en medio sólido como líquido. Entre ellas, dos cepas de *Exophiala equina* solubilizaron TCP, sin embargo sólo una de ellas fue capaz de solubilizar FA; una cepa de *Curvularia arcana* logró solubilizar ambas fuentes de P, mientras que *Microdochium* sp. solo solubilizó TCP. Sin embargo, en un estudio anterior, Rothen *et al.*, (2018) caracterizaron fisiológicamente una cepa de *Microdochium bolleyi* aislada de raíces de trigo en un campo agronómico de la provincia de Buenos Aires, sin que se detectara capacidad para solubilizar P.

Análisis de caracteres de DSE asociados a estrategias nutricionales

Como se mencionó anteriormente, los efectos reportados de los DSE en las plantas hospedantes varían desde interacciones negativas hasta positivas. Esta variabilidad en la naturaleza de las asociaciones no es sorprendente, dado el amplio rango de hongos que han sido clasificados como DSE, el uso de aislamientos fúngicos no identificados en los experimentos, y la amplia variedad de diseños experimentales y condiciones del ambiente utilizados por los investigadores (Grünig *et al.*, 2002).

Esta variabilidad sugiere que la asociación puede considerarse como una interacción flexible, cuya direccionalidad, hasta cierto punto, está determinada por pequeñas diferencias en la expresión génica fúngica en respuesta al hospedante y también por el reconocimiento del hospedante y su respuesta frente a la presencia del hongo. Varios estudios que examinaron la relación entre el genotipo del hospedante y la expresión del estilo de vida simbiótico mutualista demostraron que cepas de algunas especies fúngicas pueden expresar estilos de vida tanto parasíticos como mutualistas dependiendo del genotipo de su hospedante. Se requiere de un equilibrio preciso entre las demandas del endofito y la respuesta de la planta, de manera que, un desequilibrio desencadena síntomas de enfermedad o el hongo es excluido por las

reacciones de defensa inducidas del hospedante. La base genética y bioquímica de un cambio de estilo de vida fúngico de endofítico a parasitario se caracteriza por un desequilibrio en el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Mengistu, 2020). En general, el cambio de estilo de vida de endofítico a patogénico o viceversa al colonizar su hospedante podría deberse a la interrupción de una comunicación equilibrada con el factor hospedante (Kuo *et al.*, 2014).

Las simbiosis de plantas con endófitos beneficiosos o neutrales comparten muchos atributos comunes con las interacciones de las plantas con patógenos. Los hallazgos recientes que surgen de los estudios de interacciones compatibles entre un hospedante y un hongo endofito han mejorado nuestra comprensión de los factores que resultan determinantes para que el hongo se comporte como un endófito o un parásito y de cómo las plantas hospedantes pueden evitar la explotación por parte de parásitos perjudiciales, pero se benefician de los endófitos mutualistas. Un pilar fundamental de las teorías clásicas de la evolución de la virulencia, es decir la cantidad de daño que los patógenos infligen a sus hospedantes, es la suposición de que la tasa de crecimiento del patógeno está positivamente correlacionada con la virulencia (Lindsay *et al.*, 2023). Sin embargo, a pesar de algunos respaldos empíricos (Ben-Ami *et al.*, 2008; De Roode *et al.*, 2008; Kerr *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2016), a menudo hay evidencia limitada de que la tasa de crecimiento y la virulencia están positivamente correlacionadas (Zhan *et al.*, 2002; Tardy *et al.*, 2019). A veces se ha encontrado que los patógenos de crecimiento más lento son incluso más virulentos que los de crecimiento más rápido (Gower y Webster, 2005; Little *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2010) lo que pone en duda la generalidad de las teorías actuales y su capacidad predictiva.

En este estudio, además de la variabilidad esperada, hemos registrado diferencias en las estrategias nutricionales entre cepas de la misma especie. Por lo tanto, resulta interesante evaluar, bajo las mismas condiciones y el mismo hospedante, la existencia de una correlación entre la tasa de crecimiento, la colonización de las raíces y la estrategia nutricional adoptada por cada cepa de hongos DSE aislados en el presente estudio. Además, aunque las cepas fueron aisladas de tejido sano, algunas de ellas mostraron una relación patogénica con las plántulas de *B. auleticus* en el ensayo de resíntesis. Esto plantea la pregunta de si la edad del hospedante puede tener un efecto en el cambio de rol de las cepas. Para analizarlo, se realizó un

ensayo en macetas donde plantas de 4 meses de *B. auleticus* fueron inoculadas con una cepa de *Setophoma terrestris*, que resultó patogénica en los ensayos de resíntesis.

Exudados de raíces

Más allá de las asociaciones que han evolucionado al tipo mutualista o patogénico, las plantas sirven de hábitat para miles de microorganismos. A diferencia de las simbiosis de rizobios-leguminosas o plantas-HMA, en las que la coevolución ha modelado resultados simbióticos específicos (Denison y Kiers, 2011), la historia evolutiva de las asociaciones planta-microbioma es menos conocida. Los exudados de las raíces, entre otros azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fitohormonas y vitaminas, pueden atraer a varios microorganismos y también pueden actuar como moléculas señalizadoras que median interacciones en la rizósfera (Olanrewaju *et al.*, 2019). Los componentes químicos de los exudados radicales tendrían la propiedad de disuadir a algunos microorganismos, pero atraer a otros (Bai *et al.*, 2022). Algunos autores consideran que en general, las asociaciones negativas expresan virulencia solo en un número limitado de especies hospedantes y se estima que en el caso de los hongos alcanzaría sólo el 2% de las especies conocidas (Nihorimbere *et al.*, 2011). De este modo, las plantas se asegurarían interacciones microbianas beneficiosas en la rizósfera seleccionando por ejemplo, cepas que mejoren la fertilidad del suelo, degraden sustancias tóxicas o induzcan la producción de metabolitos secundarios en la planta (Chamkhi *et al.*, 2022).

Las raíces de las plantas liberan una variedad de compuestos químicos que actúan como nexo que permite la comunicación entre la vegetación y el suelo (Fujii *et al.*, 2021), la que permite garantizar beneficios que mejoran la resistencia de las plantas a las amenazas y aseguran su desarrollo normal. Los exudados de las raíces juegan un papel vital en la regulación de la composición microbiana del suelo y en las propiedades químicas y físicas del suelo (Nardi *et al.*, 2000; Oburger *et al.*, 2018). Al mismo tiempo, el estado de crecimiento y desarrollo, junto con los patrones de secreción de las raíces de las plantas, responden a los cambios en el suelo. Por lo tanto, los exudados de las raíces son un factor significativo en la retroalimentación planta-suelo.

En el siglo pasado, se introdujo el término "rizósfera" como un "hot spot" microbiano del sistema radicular (Hartmann *et al.*, 2008). La región rizosférica, una zona específica alrededor de la raíz, alberga diversos tipos de microorganismos, principalmente bacterias, hongos, nematodos, larvas de insectos, ácaros, amebas y protozoos (Bonkowski *et al.*, 2009). Los microorganismos de la rizósfera dominan el ciclo de los nutrientes en sistemas planta-suelo (Singh y Mukerji, 2006). Estos microorganismos pueden incrementar la capacidad de las plantas para adquirir nutrientes del suelo, ya sea aumentando la superficie de absorción de la raíz, debido por ejemplo a la formación de una red extrarradical que permite alcanzar microporos del suelo al que no acceden las raíces, o solubilizando macronutrientes, tales como P y azufre (Smith y Read, 2010). Por otro lado, el crecimiento microbiano en el suelo está limitado por carbono (Mukerji, 2002), por lo que los exudados de raíz podrían jugar un rol importante. Estos exudados están compuestos por carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos esenciales, ácidos orgánicos, enzimas hidrolíticas, hormonas reguladoras del crecimiento, vitaminas, nucleótidos, flavonoides, polifenoles, esteroles y compuestos orgánicos volátiles (Hartmann *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2018; Ankati y Podile, 2019). Se estima que entre un 5 y un 23% del carbono fotosintéticamente asimilado es transferido a la rizósfera a través de los exudados de raíz (Walker *et al.*, 2003; Marschner, 2012).

La composición de los exudados de las raíces puede verse afectada cuantitativa y cualitativamente por diferentes factores físicos y químicos. La mayoría de los factores químicos y físicos que afectan el proceso de exudación de las raíces se consideran estrés abiótico, como la sequía, la alta salinidad, las inundaciones, las temperaturas extremas o la carencia de nutrientes (Henry *et al.*, 2007; Carvalhais *et al.*, 2011; Khorassani *et al.*, 2011). Diferentes factores biológicos, intrínsecos a la planta, también afectan la exudación de las raíces, incluyendo el genotipo y la edad de la planta. El tipo y la cantidad de los compuestos sintetizados y liberados por las raíces están bajo control genético de la planta (Czarnota *et al.*, 2003; Micallef *et al.*, 2009). Además, la presencia de microorganismos en la rizósfera puede afectar el crecimiento de las plantas de manera positiva o negativa, y estas relaciones están ampliamente moduladas por los exudados de las raíces de las plantas (Schrey *et al.*, 2015; Dessaix *et al.*, 2018).

La asociación que las plantas establecen con los endofitos *Epichloë* puede influir en los ciclos biogeoquímicos que ocurren a nivel del suelo (Guo *et al.*, 2016). En *Schedonorus arundinaceous*, se ha registrado que los exudados de raíces de plantas E+, difieren en la composición química de los exudados provenientes de raíces E- (Guo *et al.*, 2015). En concordancia con estos resultados, Rojas *et al.*, (2016) observaron que la comunidad de hongos rizosféricos en plantas de *S. arundinaceous* difería significativamente entre plantas E+ y E-. Este estudio reveló que la diversidad fúngica cambia sustancialmente, presentando una mayor abundancia de Glomeromycota y una menor abundancia de Ascomycota fitopatógenos en la rizósfera de plantas E+. Estudios realizados en gramíneas silvestres nativas también apoyan estas observaciones. En *Bromus pictus* y *B. auleticus*, se han detectado, en estudios *in vitro*, efectos diferenciales de los exudados obtenidos tanto de plantas E+ y E-, como de cultivos de *Epichloë* sobre parámetros pre-infectivos e infectivos de HMA. Estos resultados, sugieren diferencias en la composición de los exudados atribuibles a la asociación del hospedante con endofitos *Epichloë* (Novas *et al.*, 2011, Vignale *et al.*, 2018).

En este Capítulo, se presentan los resultados de ensayos *in vitro* de co-cultivo dual entre diferentes DSE y endofitos *Epichloë*, con el objetivo de evaluar el tipo de interacción entre estos organismos.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Determinadas cepas de hongos DSE tienen la capacidad de solubilizar distintas fuentes de fósforo inorgánico.
- Las cepas de DSE con estrategias endofíticas presentan tasas de crecimiento y patrones de colonización diferentes en comparación con las cepas patogénicas.
- *Epichloë* tiene un efecto diferencial sobre el crecimiento de las cepas DSE que es dependiente de su estrategia nutricional.
- Ciertas cepas de DSE con estrategia patogénica identificadas como *Setophoma terrestris* pueden mostrar menor virulencia a) en plantas adultas de *B. auleticus* que en plántulas y b) en plantas adultas asociadas a *Epichloë platensis* en comparación con las plantas no asociadas.

OBJETIVOS PARCIALES

- Evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de las cepas de DSE aisladas de *B. auleticus*.
- Analizar y establecer el grado de correlación entre los patrones de colonización en el hospedante y las tasas de crecimiento de las cepas DSE y la relación con su estrategia nutricional.
- Evaluar el efecto de los exudados de *Epichloë* sobre el desarrollo *in vitro* de cepas de DSE con diferentes estrategias nutricionales.
- Evaluar el efecto de una cepa de *Setophoma terrestris* sobre plantas adultas de *Bromus auleticus* asociadas o no a *Epichloë*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En función de los objetivos propuestos, se plantearon 4 ensayos independientes:

Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo de las cepas de DSE.

La estrategia para la selección de hongos solubilizadores de fósforo (HSF) es utilizar un medio selectivo definido que carezca de fuentes disponibles de P soluble. El medio de cultivo National Botanical Research Institute Phosphate (NBRIP) es un medio sintético que fue propuesto como adecuado y apropiado para esta función y es ampliamente utilizado. Dicho medio presenta alta concentración de glucosa como fuente de carbono y una baja concentración de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, condiciones que han sido reportadas como óptimas para la solubilización de P (Nautiyal, 1999). El medio NBRIP puede ser utilizado tanto en forma agarizada como líquida. En medio agarizado, permite evaluar cualitativamente la solubilización de P mediante la visualización de un halo de decoloración alrededor del micelio (Katznelson *et al.*, 1962). En medio NBRIP líquido, se puede medir analíticamente la concentración de P disuelto en el medio mediante técnicas colorimétricas. Como fuente de P se estableció el uso de fosfato tricálcico (TCP) con una tasa de solubilización baja a media (Haynes, 1982). Se realizaron dos ensayos para evaluar la capacidad de solubilización de P de las cepas de DSE aisladas. En el primero, todas las cepas aisladas fueron cultivadas en NBRIP agarizado suplementado con TCP como fuente de P. En el segundo ensayo, las cepas que produjeron halo de solubilización y que fueron identificadas como endofíticas en el capítulo 1, fueron cultivadas en medio NBRIP líquido suplementados con tres fuentes de P.

- **Ensayo 1.** Evaluación de cepas solubilizadoras de P en medio NBRIP sólido.

Con el fin de seleccionar las cepas con capacidad de solubilizar fósforo, se realizó un estudio sobre todas las cepas de DSE en placas de Petri (Ø 9 cm) con medio sólido NBRIP (Nautiyal, 1999). Se utilizó TCP como fuente de P y cada cepa fue sembrada por triplicado. Como control se utilizó el mismo medio sin inocular. Las cajas de Petri se incubaron a 23°C en oscuridad. El seguimiento de los cultivos se realizó durante 15 días. Aquellas cepas que presentaron un halo de solubilización alrededor de la colonia fueron seleccionadas para continuar el estudio de solubilización de P en medio líquido (**Fig. 2.1**).

- **Ensayo 2.** Cuantificación de la solubilización de P

Para cuantificar la capacidad de solubilización de P de las cepas seleccionadas en el ensayo 1 se realizó un estudio utilizando medio NBRIP líquido. En este ensayo se incorporaron nuevas fuentes de P. En total se utilizaron tres fuentes: fosfato tricálcico (TCP), fosfato ferroso (FF) y fosfato de aluminio (FA). En el ensayo 1 se detectaron 6 cepas con capacidad para solubilizar P (**Fig. 2.1**). Para esta etapa, entre las 6 se descartaron las que habían resultado patogénicas en el ensayo de resíntesis y una cepa endofítica (63) que comenzó a presentar irregularidades en su desarrollo en cultivo. Entre las dos restantes se seleccionó la cepa C71A, identificada como *Thelonectria blackeriella* que fue la que presentó la mayor mayor crecimiento, a nivel de diámetro de la colonia, en medio sólido NBRIP, además de una promoción del crecimiento bajo distintas concentraciones de exudados de *Epichloë* (Capítulo 2).

El ensayo contó con un diseño factorial aleatorizado. Los factores analizados fueron fuente de P (3 niveles) y cepa de DSE (1 niveles). Se utilizaron 5 réplicas por tratamiento. Las muestras se cosecharon al vigésimo día.

Procedimiento

Condiciones de crecimiento, cosecha y curva de calibración

Se realizó una curva de calibración con una cepa (*Thelonectria blackeriella*, C71A). Para ello se colocaron 0,1 g de TCP y se adicionaron 20 ml de medio líquido NBRIP en Erlenmeyers de 125 ml. La cepa fue cultivada en medio agar extracto de malta (AEM) para preparar el inóculo de este ensayo. Se sembraron tres fragmentos (\varnothing 0,7 mm) tomados del borde de la colonia en cada Erlenmeyer. Como control, se agregó un taco de AEM. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 7.00 con hidróxido de sodio 1M. Los erlenmeyers fueron mantenidos en agitación constante (150 r.p.m) a 23 °C en oscuridad. Para construir la curva de calibración, se cosecharon cinco Erlenmeyers inoculados y cinco de control a los 2, 5, 8, 13 y 20 días de incubación. Al momento de la cosecha, se filtró el cultivo al vacío utilizando un Kitasato, un embudo Büchner y papel de filtro. El extracto líquido fue congelado (-20°C) para la posterior medición de P soluble (ppm) con el kit Spectroquant Phosphate Test (Art. N 1.14842 Merck). El micelio retenido en el papel de filtro fue secado durante 48 horas en estufa a 60°C, y luego se colocó en un desecador durante 4 horas con sílica gel. Transcurrido ese

tiempo, se registró el peso seco (g). La curva de calibración se realizó con el medio filtrado, utilizando NBRIP como solvente y una solución patrón que contenía 8g/L de K_2HPO_2 (detalles en Anexo). De acuerdo a los resultados obtenidos, se elaboró una curva de crecimiento considerando también la solubilización de P en el tiempo, con el fin de seleccionar el tiempo de cosecha para los siguientes ensayos.

Ensayo de solubilización con 3 fuentes de fósforo

En esta etapa se trabajó con la misma cepa y bajo las mismas condiciones de crecimiento y cosecha mencionadas previamente. Sin embargo en esta ocasión el medio líquido NBRIP fue suplementado con las diferentes fuentes de P (TCP, FF, y FA). Cada fuente de P fue suministrada al medio en una concentración de 3.22×10^{-2} M, equivalente a la concentración estándar de P en el TCP (10 g/L) utilizada en el medio NBRIP (Nautiyal, 1999). En el vigésimo día, cuando la solubilización alcanzó su máximo de acuerdo con la curva de calibración, el medio líquido se filtró al vacío. Tal como se explicó previamente, el micelio retenido en el papel de filtro fue secado durante 48 hs en estufa a 60° C, para la posterior determinación de peso. Como control se utilizó el mismo medio sin inocular, con el fin de conocer los valores de solubilización no biológica de P. Los valores de P soluble (ppm) del control fueron restados a los de los distintos tratamientos.

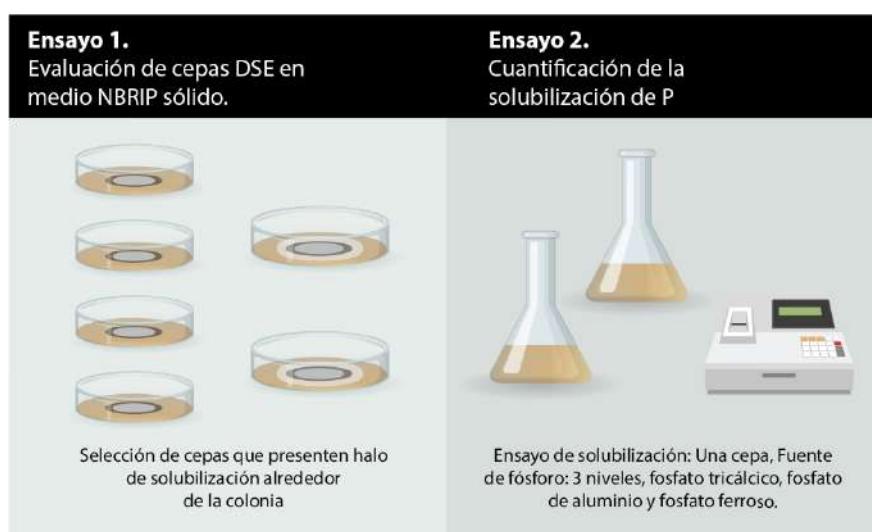


Fig. 2.1. Esquema de la metodología a seguir para los ensayos de solubilización de fósforo en medio sólido y medio líquido NBRIP.

Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre tratamientos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, adecuada para N bajos y datos que no cumplen con la normalidad ni homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se realizaron comparaciones a posteriori mediante el test de Dunn, ajustando los valores de significancia con el método de Benjamini-Hochberg para controlar el error tipo I. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt).

Evaluación de la correlación entre el patrón de colonización, la tasa de crecimiento y estrategia nutricional

Para evaluar la existencia de correlación, la estrategia nutricional se determinó según los resultados de la resíntesis realizada en el Capítulo 1, donde cada aislamiento fue clasificado como endofito o patógeno. La colonización del hospedante (porcentajes de colonización establecidos por micelio septado oscuro, micelio hialino o microesclerocios), se estableció en los mismos fragmentos de raíces de las plántulas, mediante la visualización del tejido radicular teñido. La tasa de crecimiento de los DSE se calculó en cultivos en AEM, utilizando el coeficiente "r".

Tasa de crecimiento intrínseca

Cada aislamiento fue repicado en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio AEM por triplicado. El crecimiento se evaluó midiendo el diámetro de la colonia en cm durante un periodo de 34 días, registrándose 15 mediciones para cada aislamiento. En cada fecha de observación se midieron dos diámetros perpendiculares por colonia y se calculó el promedio. Para cepa se ajustó un modelo de crecimiento logístico a los datos de crecimiento utilizando la función *nls* (Nonlinear Least Squares) en R, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{diam} = \frac{K}{1 + \exp(-r \cdot (\text{dias} - t_0))}$$

donde el parámetro K indica el diámetro máximo alcanzado, r representa la tasa de crecimiento y t0 es el tiempo en el que se observa el crecimiento más rápido.

Colonización de raíces

Cuando se cosecharon las plántulas durante la resíntesis, una fracción de las raíces se utilizó para aislar a los DSE y la otra para cuantificar la colonización. Las raíces se lavaron con agua de la canilla para remover restos del sustrato adherido a ellas y se tiñeron inmediatamente con Trypan Blue (Phillips y Hayman, 1970). Luego, se clarificaron por inmersión en una solución de KOH 10 % y se dejaron por 30 minutos a 90 °C. Se enjuagaron con agua de la canilla y luego se sumergieron en una solución de HCl 0.2 N durante 3 minutos para neutralizar los restos de KOH. Posteriormente se sumergieron en una solución de Trypan Blue (0,02 %) por 15 minutos a 90 °C. Por último se colocaron en ácido láctico para su conservación y posterior observación al microscopio óptico. La cuantificación se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por McGonigle *et al.*, (1990). Se registraron todas las hifas septadas, melanizadas o no, y los microesclerocitos observados al microscopio en 150 campos por planta, o los disponibles en caso de un sistema radical pobremente desarrollado, usando segmentos de 1 cm de longitud.

Análisis estadísticos

Para el análisis de todas las cepas (N=29), se calculó la matriz de correlación para las variables: estrategia nutricional (endofito, patógeno); estatus endofítico de la planta donde fue aislado, tasa de crecimiento intrínseca, diámetro máximo alcanzado por la colonia. Se calculó el *p* valor para cada correlación.

Además, en los casos en que la masa radicular permitió evaluar colonización (N=8), se calculó la matriz de correlación para los datos: estrategia nutricional (endofito, patógeno); estatus endofítico de la planta donde fue aislado, tasa de crecimiento intrínseca, diámetro máximo alcanzado por la colonia; hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO) y microesclerocitos (M). Las cepas analizadas fueron: *Microdochium bolleyi* (C23A2, C51, G2), *Setophoma terrestris* (C53), *Hymenoscyphus* sp. (C54), *Periconia macrospinosa* (C87), *Thelonectria blackeriella* (C71A) y *Herpotrichicha* sp. (CG5B). Se calculó el *p* valor para cada correlación. También se realizó un análisis multivariado a través de un Análisis de Componentes Principales (PCA) para explorar la estructura subyacente de los datos y para identificar patrones

de variabilidad entre las variables. Este análisis proporciona una visión general de cómo se agrupan o diseminan las observaciones en función de las variables consideradas. Finalmente, se analizó la existencia de correlación entre la variable “estatus” y las componentes principales resultantes del análisis anterior.

Efecto de los endofitos *Epichloë* sobre el desarrollo *in vitro* de cepas de DSE.

Aislamiento *Epichloë* a partir de plantas bajo estudio

Para aislar una cepa de *Epichloë platensis*, se esterilizaron superficialmente fragmentos de 0.5 mm de muestras de tejido de vástago de *B. auleticus* del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, en una parcela con plantas asociadas o no a *E. platensis*. El protocolo de esterilización incluyó una inmersión en etanol al 70% v/v durante 1 minuto, seguida de una inmersión en hipoclorito de sodio al 3% p/v durante 15 minutos, y un enjuague en una solución de etanol al 50% v/v durante 1 minuto. Posteriormente, los fragmentos se sembraron en placas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), incubados en la oscuridad a 23°C y revisados regularmente para detectar el crecimiento fúngico.

Exudados de *Epichloë platensis*

Se seleccionó al azar uno de los aislamientos de *E. plantensis* para obtener sus exudados. Este aislamiento se cultivó en Erlenmeyers de 125 ml de medio líquido estéril Glucosa-Asparagina (GA) (Galvagno, 1976), en condiciones de agitación a 150 rpm a 23 °C durante 15 días. Luego, la biomasa fúngica fue separada del medio mediante una filtración con papel de filtro en vacío utilizando un kitasato y un embudo de Büchner. Finalmente, el medio de cultivo se esterilizó dos veces por filtración a través de una membrana de Millipore de 0.22 mm. Los exudados del endofito se conservaron a -20 °C.

Efecto de los exudados de *Epichloë* en el crecimiento de cepas de DSE

Para analizar el efecto de los exudados del aislamiento de *E. platensis* sobre el desarrollo *in vitro* de cepas de DSE, el aislamiento seleccionado se cultivó en medio AEM, suplementado con exudados en concentraciones de 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v),

según Novas *et al.*, (2011). Como control se utilizó el mismo volumen de medio GA estéril en lugar de exudados. Las placas de Petri (\varnothing 9 cm) se incubaron en oscuridad a 24 °C durante 20 días o hasta que el micelio alcanzó el borde de la placa. Cada día se midieron dos diámetros perpendiculares de la colonia en las mismas cajas de Petri y se calculó el promedio de estos dos valores. Para poner a punto la metodología, se realizó un ensayo preliminar (**Fig. 2.2**) donde se emplearon dos cepas, una con estrategia endofítica: *Microdochium bolleyi* (C23A2) y otra con estrategia patogénica *Setophoma terrestris* (C53) en el ensayo de resíntesis. El ensayo presentó un diseño experimental factorial completamente aleatorizado, que incluyó dos factores: concentración de exudados (cinco niveles: 0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) y día de observación. La concentración de exudados y el día de observación se trataron como factores fijos. Se realizaron cinco repeticiones para cada tratamiento en el experimento.

Ensayo principal

Una vez analizados los resultados del ensayo preliminar, se decidió repetirlo, incorporando más cepas endofíticas y patogénicas. En este ensayo se utilizaron nuevamente las cepas *Microdochium bolleyi* (C23A2) y *Setophoma terrestris* (C53) y se incorporaron las cepas: *Thelonectria blackeriella* (C71A) y *Herpotrichia* sp. (CG5B) que resultaron endofíticas y con capacidad de solubilizar P y *Poaceascoma helicoides* (CE8) como patogénica (**Fig. 2.2**), bajo las mismas condiciones del ensayo preliminar.

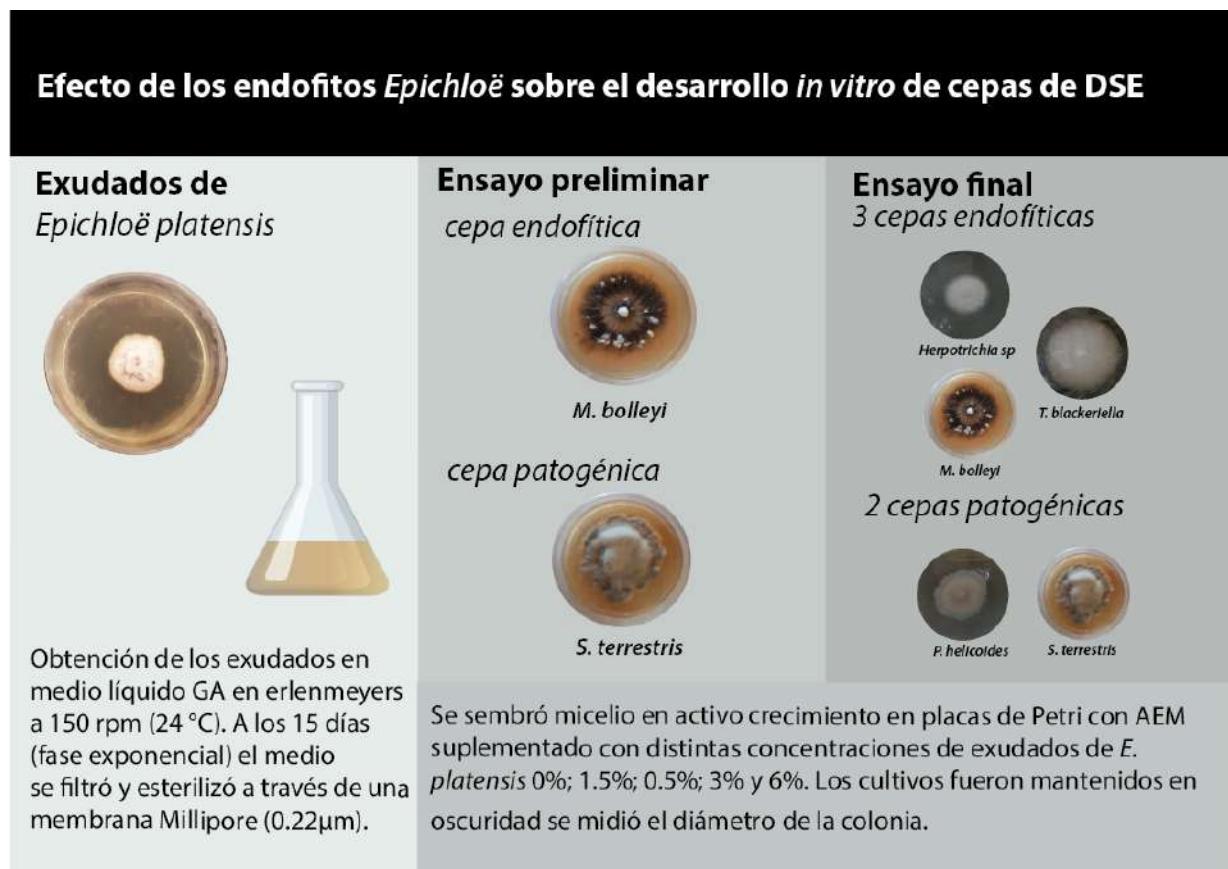


Fig. 2.2. Esquema del ensayo efecto de los exudados de *Epichloë* en el crecimiento de cepas de DSE. Primero se obtuvieron los exudados de *E. platensis*, posteriormente se realizó un ensayo preliminar, con dos cepas y finalmente un ensayo principal con 5 cepas total, algunas endofíticas y otras patogénicas.

Análisis Estadísticos

Las diferencias en el crecimiento de cada cepa de DSE se evaluaron considerando los dos factores fijos. Dado que las observaciones se realizaron sobre las mismas cajas de Petri, se incluyó la variable “caja” como variable aleatoria. La varianza se modeló a través de modelos que consideraron la interacción y los efectos aditivos. Se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. La idoneidad del modelo se comparó utilizando el criterio de información de Akaike (AIC).

También se realizó un análisis para evaluar comparativamente las diferencias en el diámetro de la colonia a los 13 días, cuando algunas de las cepas alcanzaron el borde de la caja. Se realizó un ANOVA de dos factores. Los factores principales fueron la concentración de exudados (5 niveles) y la identidad de la cepa de DSE (2 ó 5 niveles, dependiendo si se tratara del ensayo preliminar o el principal). Para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, utilizamos weights=varldent

para ajustar un modelo de varianza con diferentes varianzas para cada nivel. Las diferencias entre tratamientos se analizaron utilizando el paquete `emmens` en R, que permite obtener medias marginales estimadas (EMMeans) para los factores involucrados en el modelo. Además, se realizó un análisis de letras homogéneas utilizando la función `cld` (comparisons of least-squares means to derive letter displays). Este método asigna letras a las medias de los grupos para indicar cuáles son significativamente diferentes entre sí. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt).

Evaluación del efecto de una cepa de *Setophoma terrestris* en plantas adultas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë*.

Cepa de *Setophoma terrestris* bajo estudio

En este ensayo se utilizó una cepa identificada molecularmente como *Setophoma terrestris* (C53), aislada de raíces de plantas sanas de *B. auleticus* y caracterizada como patogénica en el ensayo *in vitro* de resíntesis (Capítulo 1). Con el objetivo de evaluar el efecto de esta cepa patogénica en plántulas, en plantas adultas E+ y E- , éstas se inocularon con *S. terrestris* (S+) o se dejaron sin inocular (S-).

Procedimiento

Se realizó un ensayo en maceta de 12 cm de diámetro (800 cm³) con plantas de 4 meses de edad. Estas se obtuvieron a partir de semillas de plantas de *B. auleticus* E+ y E- que fueron esterilizadas superficialmente. Tal como se realizó en el Capítulo 1, las semillas utilizadas se trataron con ácido sulfúrico al 50% durante 30 minutos para eliminar la palea y la lemma y posteriormente, se lavaron con agua de la canilla seguida de NaClO (50%) durante 1 hora. Por último, fueron enjuagadas con agua destilada estéril. Todos los pasos mencionados se realizaron en condiciones de agitación. Este procedimiento permite eliminar la palea y lemma, sin dañar al embrión y luego proceder con la esterilización superficial de la semilla. Las semillas se incubaron a 23 °C en placas Petri (9 cm) con papel de filtro humedecido con 2 ml de agua destilada esterilizada. Las semillas utilizadas se sumergieron 1 minuto en solución etanol 70%, luego 10 minutos en lavandina-agua 1:1, y por último en etanol 50%. Una vez esterilizadas, se colocaron 20 semillas de cada estatus endofítico en

cajas de Petri de 90 Ø mm con dos papeles de filtro, estériles, que fueron humedecidas con 2 ml de agua estéril. Luego de 2 semanas de haber germinado, las plántulas de tamaño uniforme fueron colocadas en macetas con el sustrato correspondiente a cada tratamiento.

Para la preparación del inóculo de la cepa de *S. terrestris* fue cultivada en cajas de Petri de 90Ø mm con AEM. El inóculo del patógeno se preparó colocando 4 tacos de agar (4 mm de lado) tomados a partir del borde de las colonias en activo crecimiento (de 7 días) en Erlenmeyers (500 ml) con el sustrato de crecimiento. Éste consistió en una mezcla estéril de 200 gr de arena, 20 gr harina de maíz y 80 ml de agua destilada. Los Erlenmeyers se agitaron manualmente cada dos días hasta alcanzar una colonización profusa y uniforme. Se colocaron 2.5 gr de inóculo por maceta. El ensayo se realizó por quintuplicado para cada tratamiento y las plantas se cosecharon a los 2 meses.

Al momento de la cosecha, se evaluó el estado general de la planta. El vástago y el sistema radical fueron separados para medir el peso fresco y seco. El sistema radical fue separado en dos fracciones: una para cuantificar peso y la otra para realizar el re-aislamiento del patógeno y teñir con Trypan Blue (Phillips y Hayman, 1970). La esterilización superficial de las raíces siguió el mismo procedimiento descripto en el Capítulo 1. Para medir el peso seco, las muestras se mantuvieron en una estufa a 60° C hasta alcanzar un peso constante (**Fig. 2.3**).

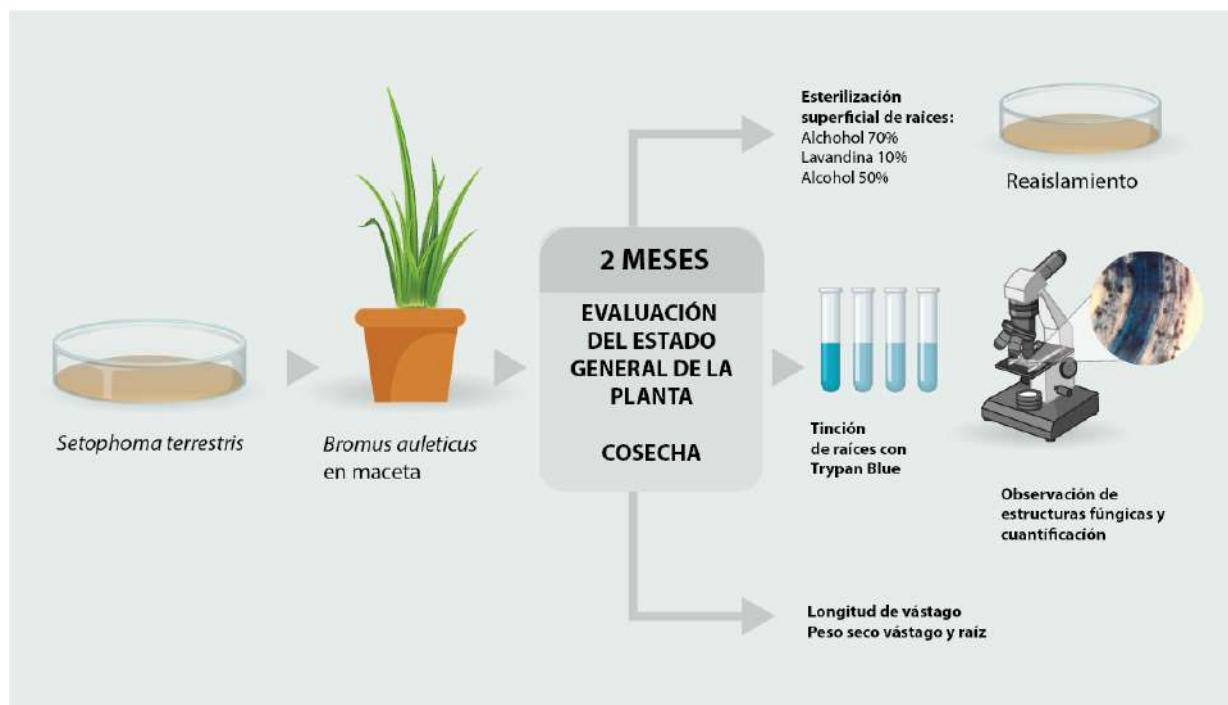


Fig 2.3. Esquema de la metodología a seguir, para evaluar la patogenicidad de *Setophoma terrestris* en plantas adultas de *Bromus auleticus*.

Estatus endofítico de *Epichloë*

El estatus endofítico fue evaluado en las plantas antes de ser cosechadas, utilizando la técnica histológica convencional detallada por Clark *et al.*, (1983). Como criterio se estableció que una planta es considerada infectada (E+) si se visualizan hifas características intercelulares colonizando el parénquima cortical (ver **Fig 1** en la Introducción general).

Diseño Experimental y Análisis estadístico

El diseño experimental fue factorial completamente aleatorizado, contando con dos factores fijos: estatus de *Epichloë* (E+/E-) y la inoculación con *Setophoma terrestris* (S+/S-). Las variables fueron analizadas por ANOVA de 2 factores utilizando el software R. Se chequearon los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Las diferencias entre tratamientos se analizaron utilizando el paquete **emmens** en R, que permite obtener medias marginales estimadas (EMMeans) para los factores involucrados en el modelo. Además, se realizó un análisis de letras homogéneas utilizando la función **cld** (comparisons of least-squares means to derive letter displays). Este método asigna letras a las medias de los grupos para indicar cuáles

son significativamente diferentes entre sí. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt).

RESULTADOS

Capacidad de solubilización de fósforo en medio sólido de las cepas de DSE

A partir del ensayo en medio sólido, seis de las 29 cepas de DSE presentaron halo de solubilización en medio NBRIP (**Tabla 2.1**). De estas seis cepas, tres fueron descartadas por resultar patogénicas en el ensayo de Resíntesis del Capítulo 1. De las tres restantes se seleccionaron las cepas identificadas como *Thelonectria blackeriella* (C71A), *Herpotrichia* sp. (CG5B) y *Magnaportheopsis* sp. (C63). Sin embargo, esta última comenzó a presentar irregularidades en el crecimiento, por lo que se excluyó de la evaluación (**Fig. 2.4**). Finalmente, se seleccionó la cepa 71A de *T. blackeriella* para avanzar en el estudio, debido a su mayor crecimiento a lo largo del tiempo, en el ensayo en presencia de distintas concentraciones de exudados de *E. platensis*, en comparación con *Herpotrichia* sp. Mientras que *Magnaportheopsis* sp. presentó un crecimiento escaso y lento en medio NBRIP por lo tanto se desestimó para estos ensayos.

Tabla 2.1. Cepas seleccionadas con capacidad de solubilizar P. (+++, ++, + simbolizan el diámetro del halo de solubilización, de mayor a menor)

Nº	Cepa	ID	Estatus endofítico	Solubilización P
1	71A	<i>Thelonectria blackeriella</i>	Endofítica	++
2	63	<i>Magnaportheopsis</i> sp.	Endofítica	+
3	51	<i>Microdochium bolleyi</i>	Patogénica	++
4	G5B	<i>Herpotrichia</i> sp.	Endofítica	+++
5	B4	<i>Tetraplosphaeria</i> sp.	Patogénica	++
6	E8	<i>Poaceascoma helicoides</i>	Patogénica	+

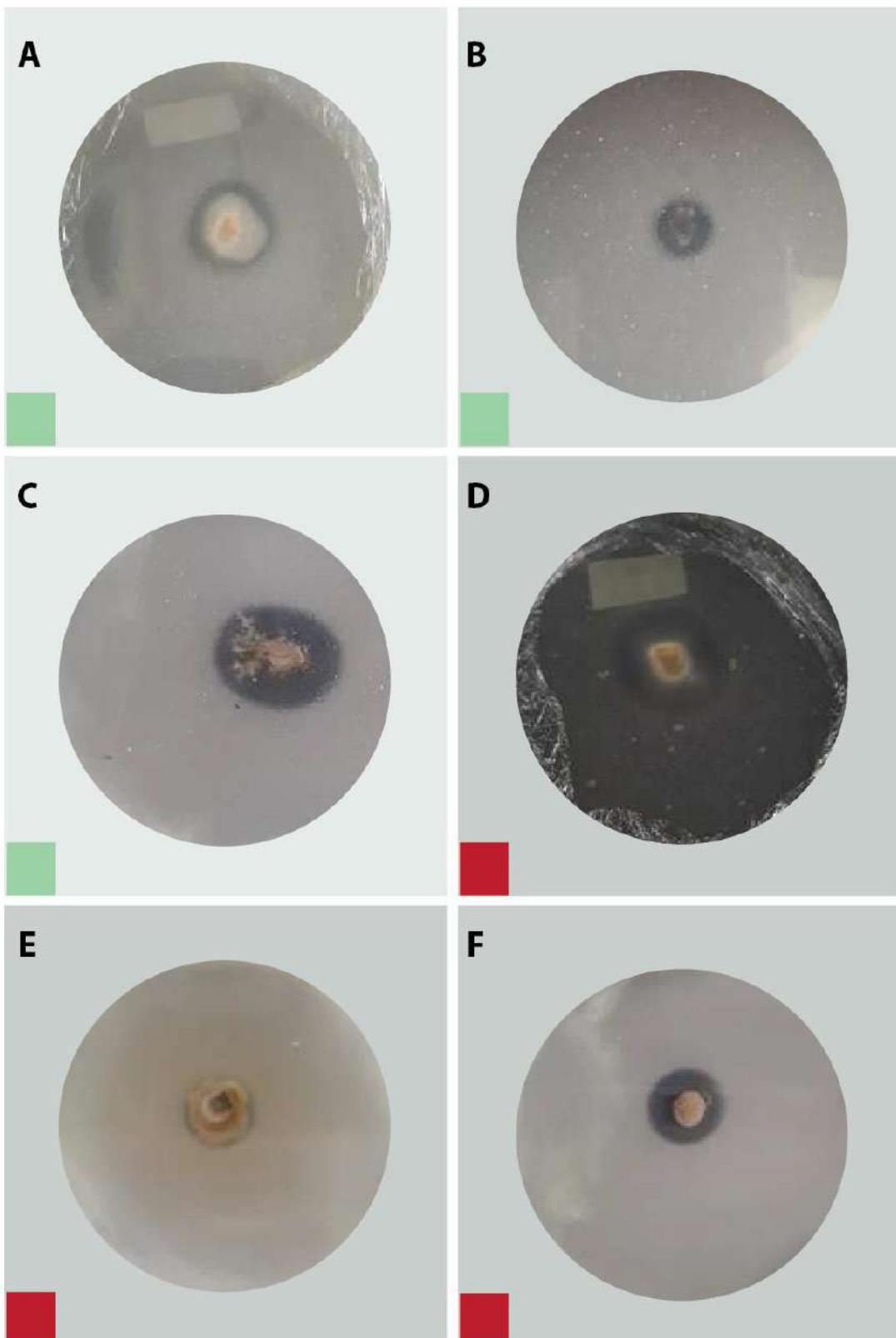


Fig. 2.4. Cepas solubilizadoras de fósforo en medio sólido NBRIP. **A.** *Thelonectria blackeriella*. **B.** *Magnaportheopsis* sp. **C.** *Microdochium bolleyi*. **D.** *Herpotrichia* sp. **E.** *Tetraplosphaeria* sp. **F.** *Poaceascoma helicoides*. A partir del ensayo de resíntesis (Capítulo 1) las cepas se clasificaron en endofíticas (verdes) y patogénicas (rojas).

Capacidad de solubilización de *Thelonectria blackeriella* en medio líquido

El ensayo de solubilización en medio líquido, mostró un incremento de P soluble a lo largo del tiempo, con un máximo al día 20, que se correlacionó con un aumento en la biomasa de *T. blackeriella* (Fig. 2.5). Asimismo se evaluó el pH, mostrando un menor valor cuando la concentración de P soluble fue máxima (Fig. 2.6).

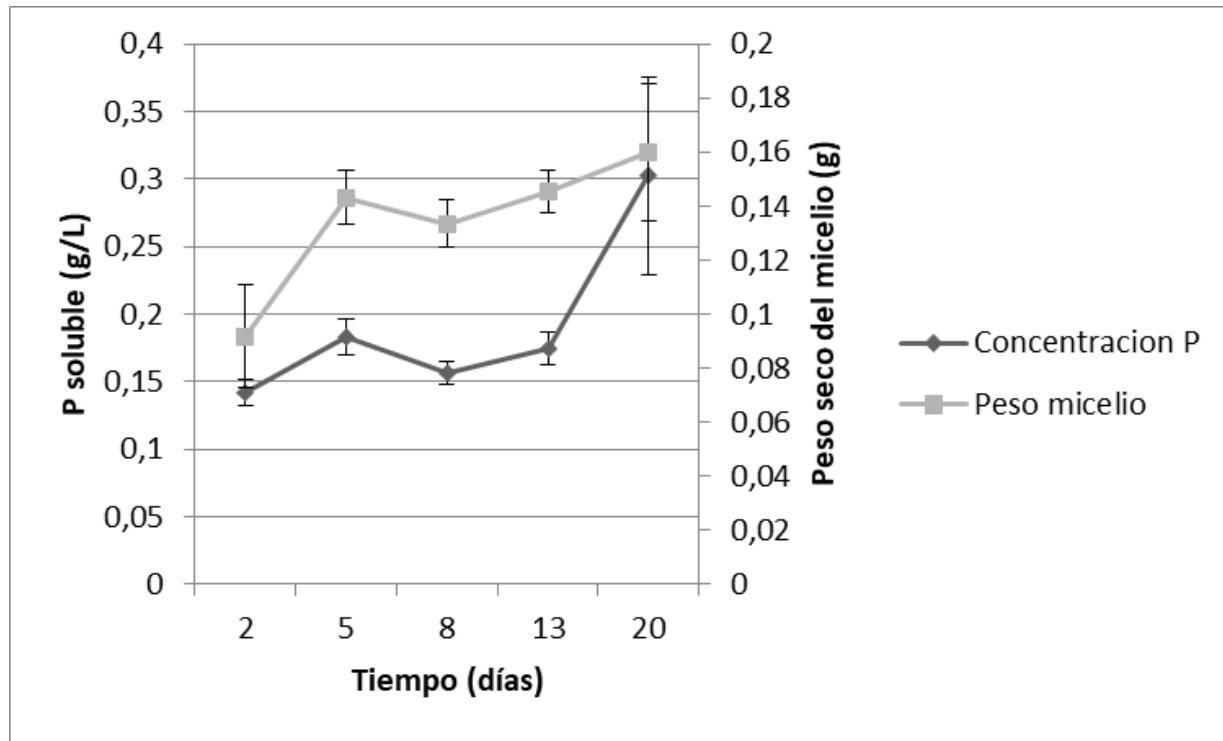


Fig 2.5. Curva de Crecimiento de *Thelonectria blackeriella* en medio líquido NBRIP, cuantificado como peso seco del micelio, y solubilización de TCP, cuantificada como P soluble.

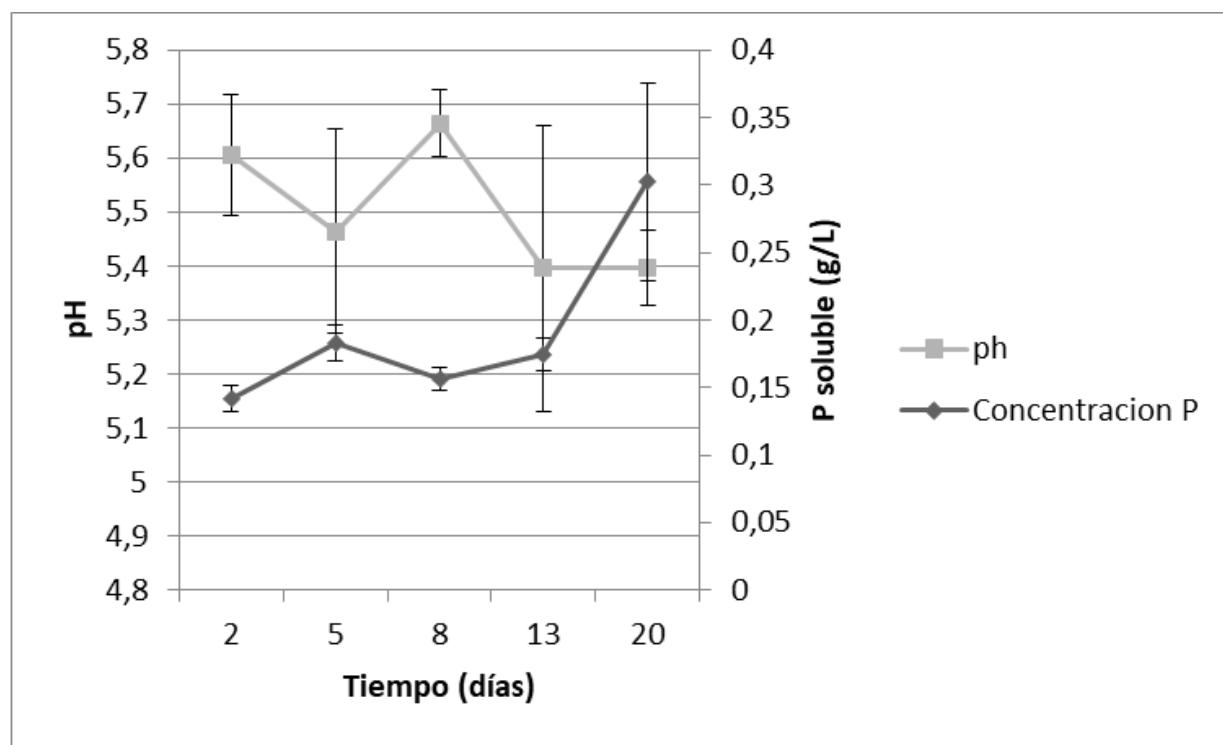


Fig 2.6. Curva de pH y P soluble de *Thelonectria blackeriella* en medio líquido NBRIP a distintos tiempos.

Capacidad de solubilización de fósforo de *Thelonectria blackeriella* a partir de diferentes fuentes de fósforo

Debido a inconvenientes metodológicos, los valores obtenidos en los controles fueron superiores a los de los tratamientos correspondientes. Por esta razón, decidimos excluir esos valores del análisis y enfocarnos únicamente en la comparación entre los tratamientos. Sin embargo, esta decisión introduce una limitación: no contamos con los valores de solubilización basal generados en los controles, lo que habría permitido realizar una comparación directa entre los tratamientos. En consecuencia, los resultados del análisis deben considerarse orientativos. Lo más relevante es que la cepa demuestra capacidad para solubilizar diferentes fuentes de fósforo (TCP, FF y FA). A continuación, presentamos los resultados obtenidos, con la advertencia de que no deben considerarse como concluyentes.

El análisis de Kruskal-Wallis evidenció diferencias significativas entre las fuentes de P evaluadas ($\chi^2 = 10.118$, $df = 2$, $p = 0.006$). Las comparaciones post hoc con el test de Dunn, ajustadas mediante el método Bonferroni, indicaron que *T. blackeriella* mostró una solubilización significativamente mayor de FA que de FF ($p = 0.004$), mientras

que no se detectaron diferencias significativas entre la solubilización de FA y TCP ($p = 0.363$) ni entre FF y TCP ($p = 0.216$), siendo la capacidad de solubilización de TCP intermedia a la de las otras fuentes de P.

En términos absolutos, la mayor solubilización de P se observó en el tratamiento FA (3.13 ± 1.08 mg/g), seguido de TCP (1.36 ± 0.41 mg/g), mientras que FF presentó la menor solubilización (0.63 ± 0.27 mg/g). Estos resultados destacan la capacidad diferencial de *T. blackeriella* para solubilizar P según la fuente utilizada (Fig. 2.7; Fig. 2.8).

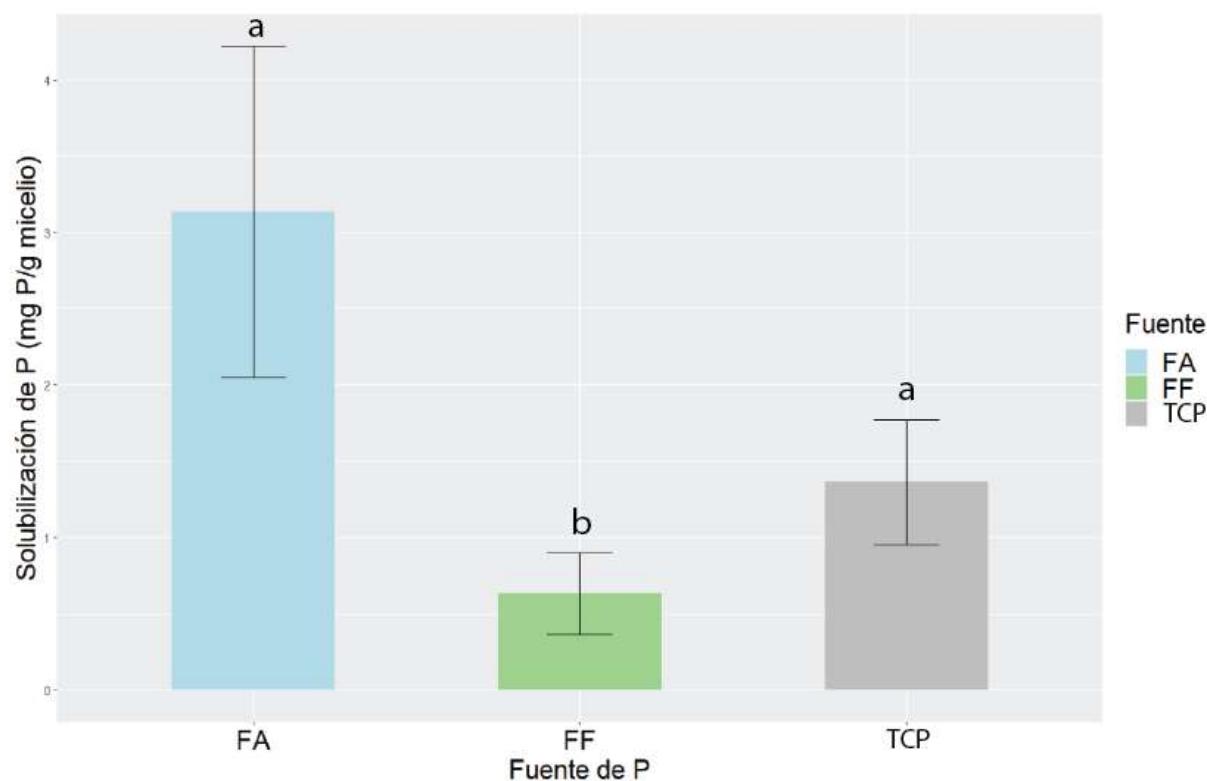


Fig 2.7. Solubilización de fosfato de aluminio (FA), fosfato tricálcico (TCP) y fosfato ferroso (FF) (g/L) con respecto a la biomasa seca de *Thelonectria blackeriella* (g-1). Las barras corresponden a la media ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.

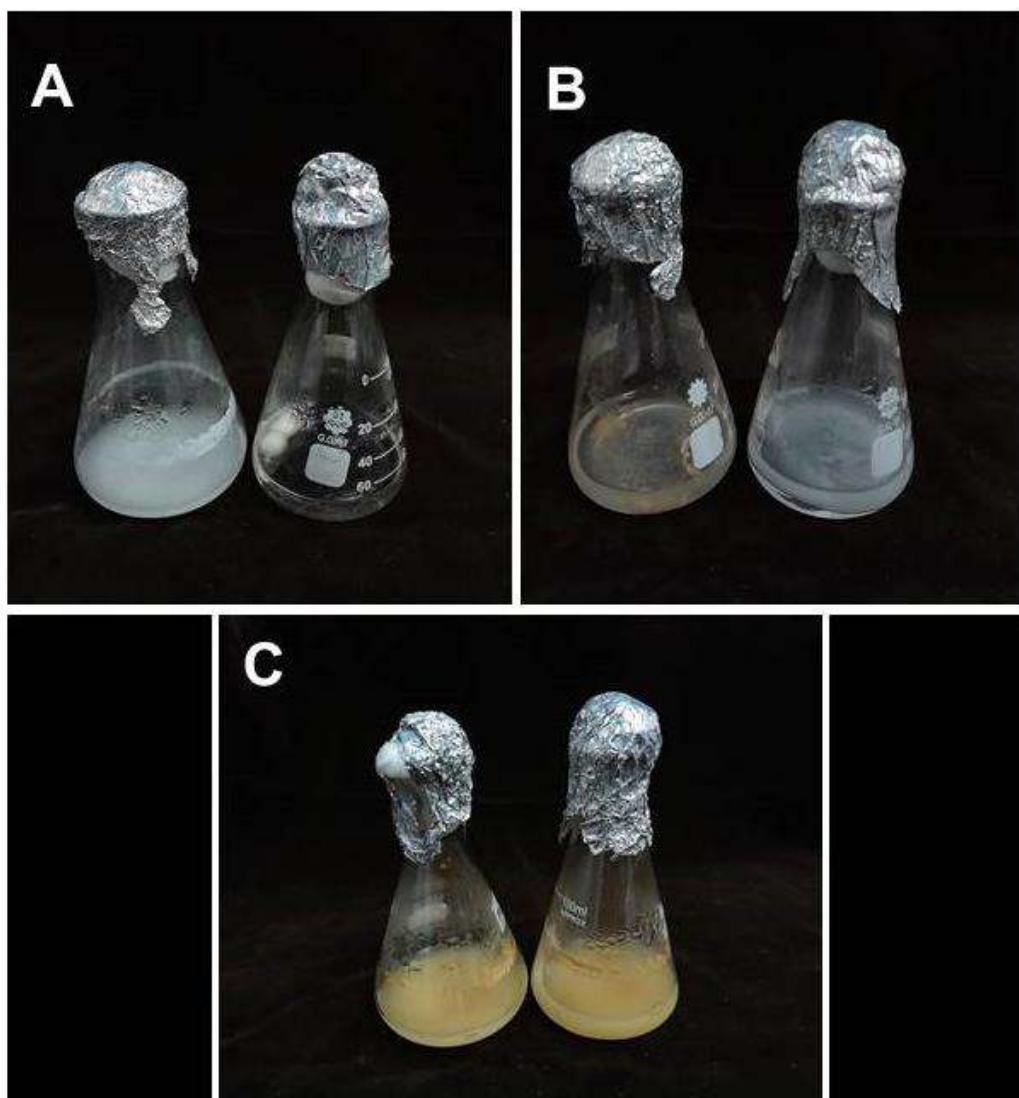


Fig 2.8. Solubilización de *Thelonectria blackeriella* al día 5 de crecimiento en medio líquido NBRIP suplementado con 3 fuentes distintas de fósforo. **A.** Fosfato tricálcico (TCP), izquierda control sin inocular, derecha tratamiento con *T. blackeriella*. **B.** Fosfato de Aluminio (FA). **C.** Fosfato ferroso (FF). B y C, izquierda tratamiento con *T. blackeriella*, derecha control sin inocular.

Evaluación de la estrategia nutricional, tasas de crecimiento y patrones de colonización de las cepas de DSE

Para todas las cepas (N=29), se realizó un análisis de correlación entre las variables: estrategia nutricional, estatus endofítico, tasa de crecimiento intrínseca y diámetro máximo alcanzado por la colonia para (Fig. 2.9). Se observó una correlación positiva no significativa ($p=0.82$) entre la estrategia nutricional y el estatus endofítico, así como entre el estatus endofítico y la tasa de crecimiento intrínseca ($p= 0.102$). La tasa de crecimiento intrínseca (r) y el diámetro presentaron una correlación positiva y

significativa ($p= 0.016$). Finalmente, la estrategia nutricional y el diámetro mostraron una correlación positiva no significativa ($p=0.56$).

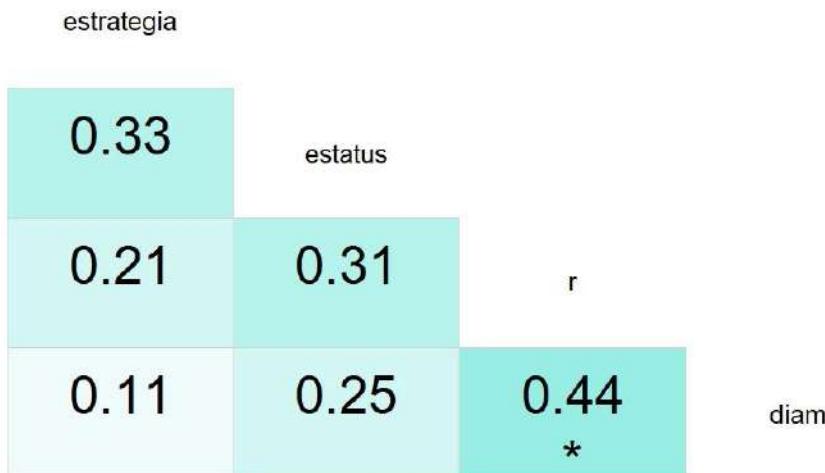


Fig. 2.9. Matriz de correlación entre las variables estrategia nutricional, estatus endofítico, tasa de crecimiento intrínseca (r) y diámetro máximo alcanzado por la colonia. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 29 datos entre las variables: estrategia= estrategia nutricional, estatus=estatus endofítico de la planta de donde la cepa DSE fue aislada, r =tasa de crecimiento intrínseca, diam= diámetro máximo alcanzado por la colonia. Los valores de p que se expresan como: * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).

Debido al escaso material de raíces disponible en algunas las plántulas, el análisis de colonización (hifas septadas hialinas, hifas septadas oscuras y microesclerocios), pudo realizarse sólo para ocho cepas. En este análisis se incluyeron las variables: estatus endofítico de la planta de donde la cepa fue aislada, estrategia nutricional (endofito, patógeno), hifas septadas hialinas, hifas septadas oscuras, microesclerocios y la tasa de crecimiento intrínseca (Fig. 2.10). Debido a la alta correlación entre tasa intrínseca y diámetro, sólo se incorporó a la tasa intrínseca.

El estatus endofítico E+ de las plantas de origen evidencia una correlación negativa significativa con las HSO ($p=0.006$) y una baja correlación y no significativa con el resto de las variables. La estrategia nutricional endofítica presentó una correlación negativa moderada con las HSH, una correlación positiva muy débil con los microesclerocios y prácticamente ninguna correlación con las HSO ni con la tasa de

crecimiento. Las HSH mostraron una correlación negativa moderada con la estrategia nutricional y una correlación débil con los microesclerocios, sin correlación con las HSO. Sin embargo, se observó una correlación negativa significativa entre las HSH y la tasa de crecimiento ($p=0.037$). Por su parte, las HSO presentaron una correlación positiva no significativa con los microesclerocios y con la tasa de crecimiento y no se detectó correlación con la estrategia nutricional ni con las HSH.

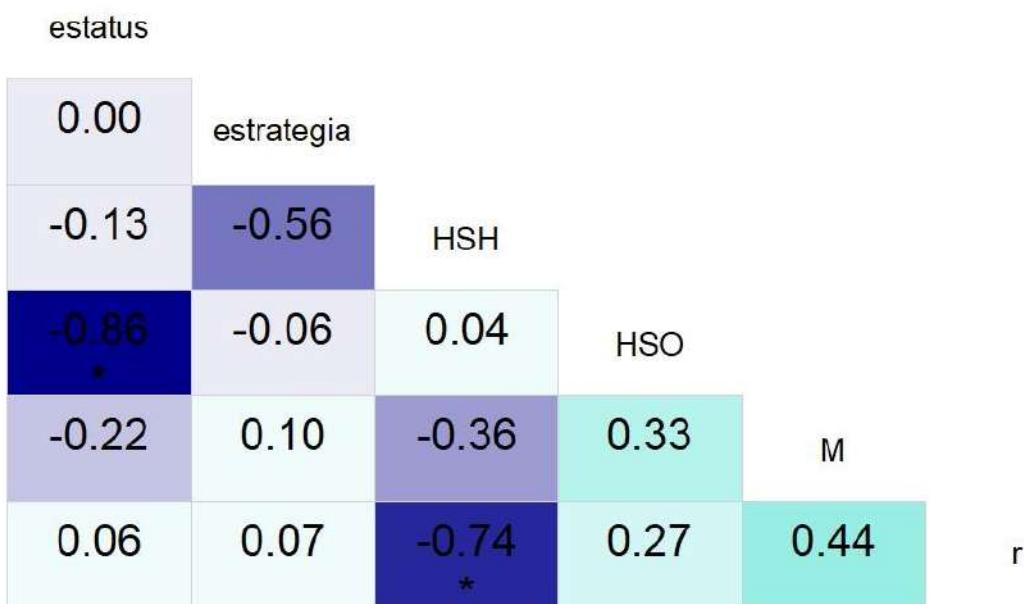


Fig. 2.10 Matriz de correlación entre las variables estrategia nutricional, estatus endofítico, tasa de crecimiento intrínseca (r) y diámetro máximo alcanzado por la colonia. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 8 datos entre las variables: estatus=estatus endofítico de la planta de donde el DSE fue aislado, estrategia= estrategia nutricional, HSH=hifas septadas hialinas, HSO=hifas septadas oscuras, M=microesclerocios y r=tasa de crecimiento intrínseca. Los valores de p que se expresan como: * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).

Se realizó un análisis multivariado a través de un Análisis de Componentes Principales (PCA). Las variables estudiadas fueron: hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO), microesclerocios (M), estrategia nutricional y la tasa de crecimiento intrínseca (r). Debido a la alta correlación entre la tasa intrínseca y el diámetro, sólo se incorporó a la tasa intrínseca. Además, en este análisis se eliminó la

variable estatus endofítico para que este factor no influyera en la distribución espacial de los datos.

Los eigenvalores obtenidos, que expresan la magnitud de la varianza capturada por cada componente principal y la proporción explicada de la varianza se muestran en la **Tabla 2.2**. El primer componente principal (PC1) explica el 45% de la varianza total en los datos, mientras que el segundo (PC2) y el tercer componente (PC3) explican el 26% y el 15% respectivamente. La contribución de cada variable original a los componentes principales se muestra en la **Tabla 2.3**. Se observa que la variable estrategia nutricional tiene una carga negativa en PC1 y PC3, y una carga positiva en PC2. La variable HSH tiene una fuerte carga positiva en PC1, sugiriendo que está altamente correlacionada con esa componente. La variable HSO tiene una carga negativa en los tres primeros componentes, especialmente en PC2. La variable microesclerocios tiene cargas negativas en las dos primeras componentes, siendo más notable en PC1. La tasa de crecimiento tiene una fuerte carga negativa en PC1 y una carga baja positiva en PC3.

Tabla 2.2. Eigenvalores y Varianza Explicada del PCA realizado en 8 cepas de DSE.

Componentes	Eigenvalores	Varianza	V. acumulada (%)
PC1	2.26	0.45	45
PC2	1.31	0.26	71
PC3	0.78	0.15	86

Tabla 2.3. Contribuciones (“species scores”) de cada variable en las tres primeras componentes. Estrategia nutricional (Estrategia), hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO), microesclerocitos (M), tasa de crecimiento intrínseca (r).

Variable	Estrategia	HSH	HSO	M	r
PC1	-0.31	0.59	-0.20	-0.44	-0.56
PC2	0.57	-0.33	-0.65	-0.35	-0.15
PC3	-0.66	0.17	-0.55	0.0098	0.47

En relación a la distribución espacial de las cepas en el plano conformado por las dos primeras componentes, se detecta que, en el cuadrante I se encuentra la cepa (G5B) de *Herpotrichia* sp. (7), con estrategia endofítica y aislada de planta E-. En el cuadrante II, cerca de la CP2 y hacia sus valores positivos, se sitúa la cepa 71A (1) de *Thelonectria blackeriella*, con estrategia endofítica y aislada de planta E+. También en este se localizan las cepas 23A2 (2) de *Michrodochium bolleyi*, y la C87 (3) de *Periconia macrospinosa*, ambas aisladas de planta E+, con estrategia endofítica y alta tasa de crecimiento. Un poco más apartada se encuentra la cepa C51 (5) también identificada como *M. bolleyi* y aislada de planta E+ pero con estrategia patogénica. En el cuadrante III se encuentra la cepa G2, identificada como *M. bolleyi* (8), con estrategia patogénica y proveniente de planta E-, esta cepa se caracteriza por alta tasa de crecimiento y alta colonización con microesclerocitos. Finalmente en el cuadrante IV se agrupan las cepas C53 de *S. terrestris* (4) y la cepa C54 de *Hymenoscyphus* sp. (6), ambas aisladas de plantas E+, con estrategia patogénica, baja tasa de crecimiento y similar colonización por HSH.

A partir del biplot (**Fig. 2.11**) generado de las componentes principales 1 (PC1) y 2 (PC2), se detectan al menos tres grupos: (i) el primer grupo está conformado por las cepas 1, 2, 3, 5 y 7, (ii) el segundo grupo por las cepas 4 y 6 y el tercero (iii) por la cepa 8. Es interesante destacar que en el grupo (i) todas las cepas, excepto la 5, presentan estrategia endofítica, aunque esta última comparte la baja abundancia de HSH. El grupo (ii) se caracteriza por cepas patogénicas provenientes de plantas E+,

mientras que en el grupo (iii) la única cepa integrante es patogénica y proviene de una planta E-.

A partir del análisis de correlación entre la variable “estatus” y las Componentes principales no se detectó existencia de correlación significativa con ninguna. Como síntesis de los resultados más destacados se puede mencionar que se observan diferencias en los coeficientes de correlación dependiendo de la cantidad de cepas analizadas. Además, las cepas con estrategia endofítica y con alta tasa de crecimiento se agrupan juntas. Por otro lado, las cepas con estrategia patogénica parecen tener diferente comportamiento, en parte debido al estatus endofítico de la planta de la que fueron aisladas. Sumado a esto, se evidencia la variabilidad de estrategias y respuestas que presentan las cepas identificadas como *M. bolleyi*.

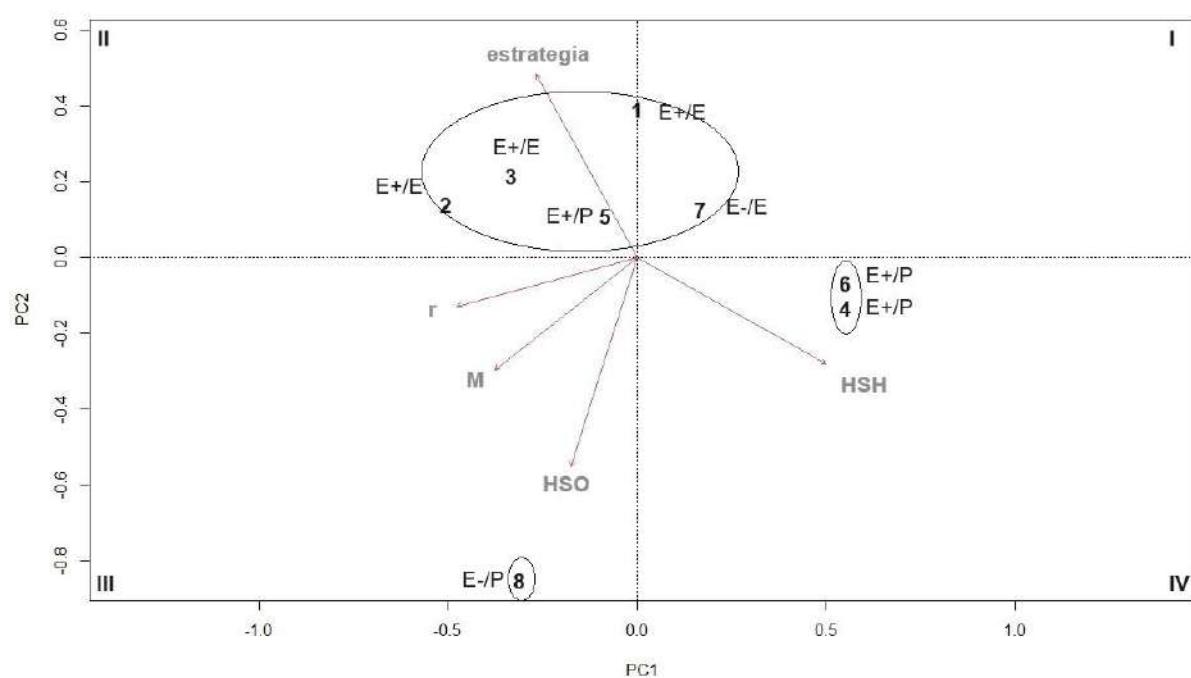


Fig 2.11. Análisis de componentes principales (PCA) realizado a partir de las variables hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO), microesclerocios (M), estrategia nutricional y la tasa de crecimiento intrínseca (r) de endofitos septados oscuros aislados plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) y plantas no asociadas (E-). Los números representan cepas de DSE. Las cepas numeradas corresponden a 1. *Thelonectria blackeriella* (C71A); 2. *Microdochium bolleyi* (C23A2); 3. *Periconia macrospinosa* (C87); 4. *Setophoma terrestris* (C53); 5. *Microdochium bolleyi* (C51); 6. *Hymenoscyphus* sp. (C54); 7. *Herpotrichia* sp. (CG5B) 8 *Microdochium bolleyi* (CG2). E+ o E- corresponde al estatus de planta aislada, mientras que E (endofítica) o P (patogénica) a la estrategia nutricional.

Efecto de los endofitos *Epichloë* sobre el desarrollo *in vitro* de cepas de DSE.

Ensayo preliminar

Para estudiar el efecto de las concentraciones de los exudados se consideraron como factores fijos al día de observación y la concentración. Sin embargo, debido al crecimiento “natural” de las cepas los primeros días, en todos los casos su efecto fue significativo por lo que no se lo incorporará al análisis de los resultados.

La cepa de *M. bolleyi* mostró un mayor crecimiento al de la cepa de *S. terrestris* en todas las concentraciones de exudados utilizadas, además de un crecimiento más uniforme a lo largo de todas las concentraciones durante todos los días de medición (**Fig. 2.13**). Esta uniformidad se refleja en las diferentes curvas de crecimiento (**Fig. 2.14; Fig. 2.17**).

Al comparar el crecimiento de las cepas en el día 13, cuando *M. bolleyi* alcanzó el borde de la colonia (dia 13), se observan diferencias significativas en el diámetro de las colonias entre las cepas de ambas especies ($F=28.68$; $p=4.062e-06$). No se detectaron diferencias debido a las concentraciones de exudados ($F=0.037$; $p=0.99$) ni una interacción significativa entre ambos factores ($F=2.56$; $p= 0.053$). La **Fig. 2.13** muestra claramente la disminución en el diámetro de la colonia de *S. terrestris* a medida que aumenta la concentración de los exudados en comparación con el control.

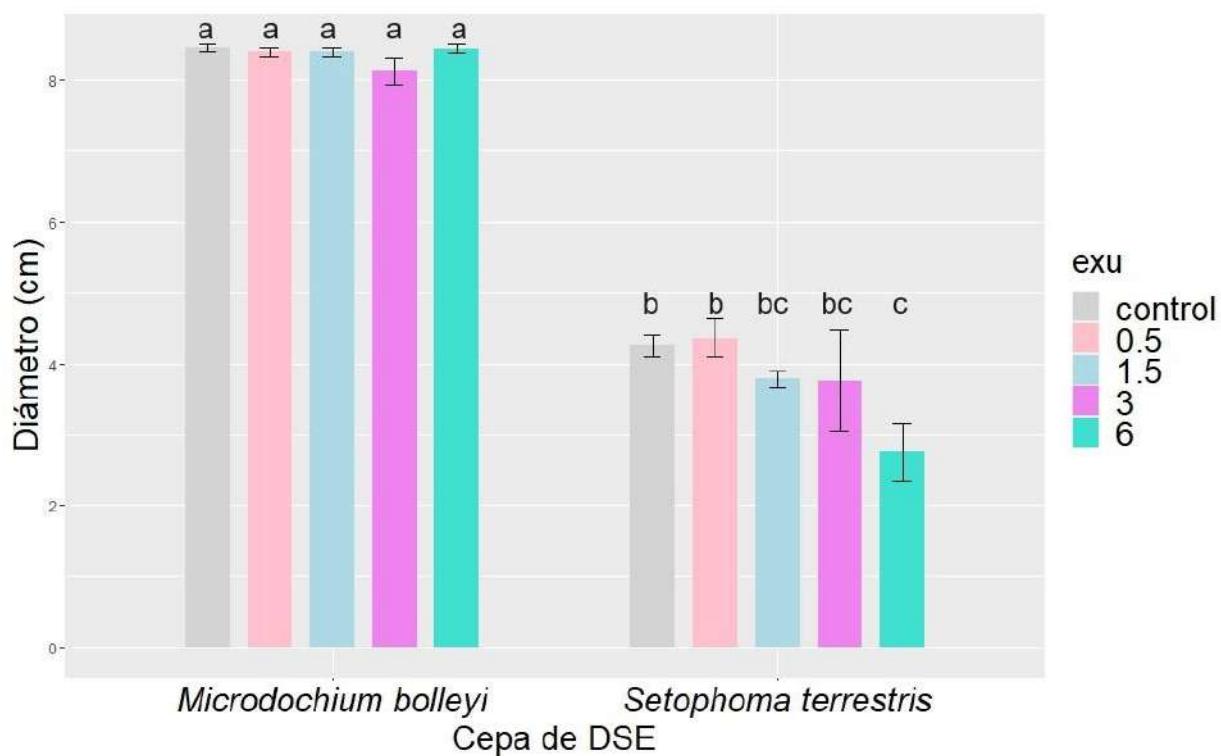


Fig. 2.13. Diámetros de las colonias de *M. bolleyi* (cepaa 23A2) y *Setophoma terrestris* (cepaa 53) en presencia de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0.5, 1.5, 3 y 6 %, V/V) al día 13 de crecimiento. Las barras de error representan el desvío estándar.

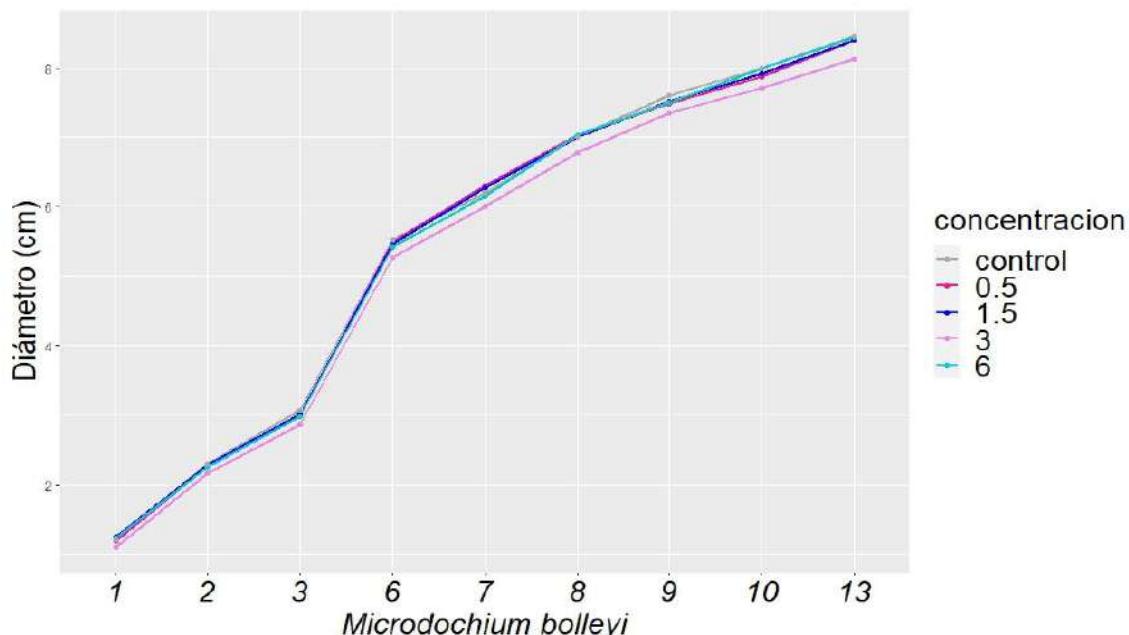


Fig. 2.14. Curvas de crecimiento de *Microdochium bolleyi* (cepaa 23A2) cultivada en medio AEM suplementado con concentraciones del 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) de exudados de *Epichloë platensis*. Las barras de error representan el desvío estándar.

En *M. bolleyi* no se observaron diferencias en los diámetros de las colonias entre el control y el agregado de exudados, salvo para la concentración de 3% que presentó en algunos puntos de la curva de crecimiento, valores inferiores al resto de los tratamientos. Sin embargo, como esta tendencia no se repite en la concentración 6%, consideramos que debe tratarse de alguna condición particular de las cajas usadas en este tratamiento. Al analizar el efecto de las concentraciones del exudado sobre la cepa se detectaron diferencias significativas ($F=3.10$; $p=0.0402$) (Fig. 2.15) para la concentración 3% en los últimos días de la curva de crecimiento evaluados. No se detectó interacción significativa entre los dos factores fijos ($F=0.63$; $p= 0.94$) (Fig 2.16).

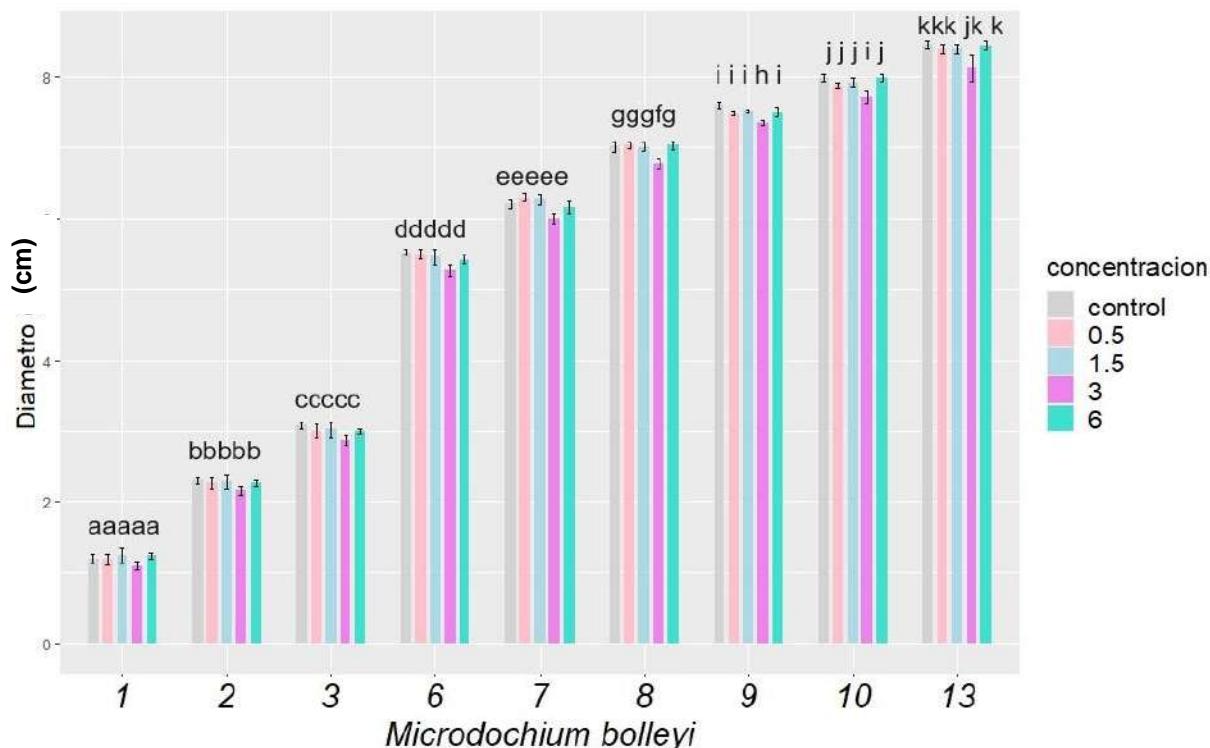


Fig. 2.15. Diámetro promedio (en cm) de colonias de *Microdochium bolleyi* (cepa 23A2) a diferentes tiempos de incubación en AEM con el agregado de diferentes concentraciones de exudados (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) obtenidos de *Epichloë platensis*. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 5$).

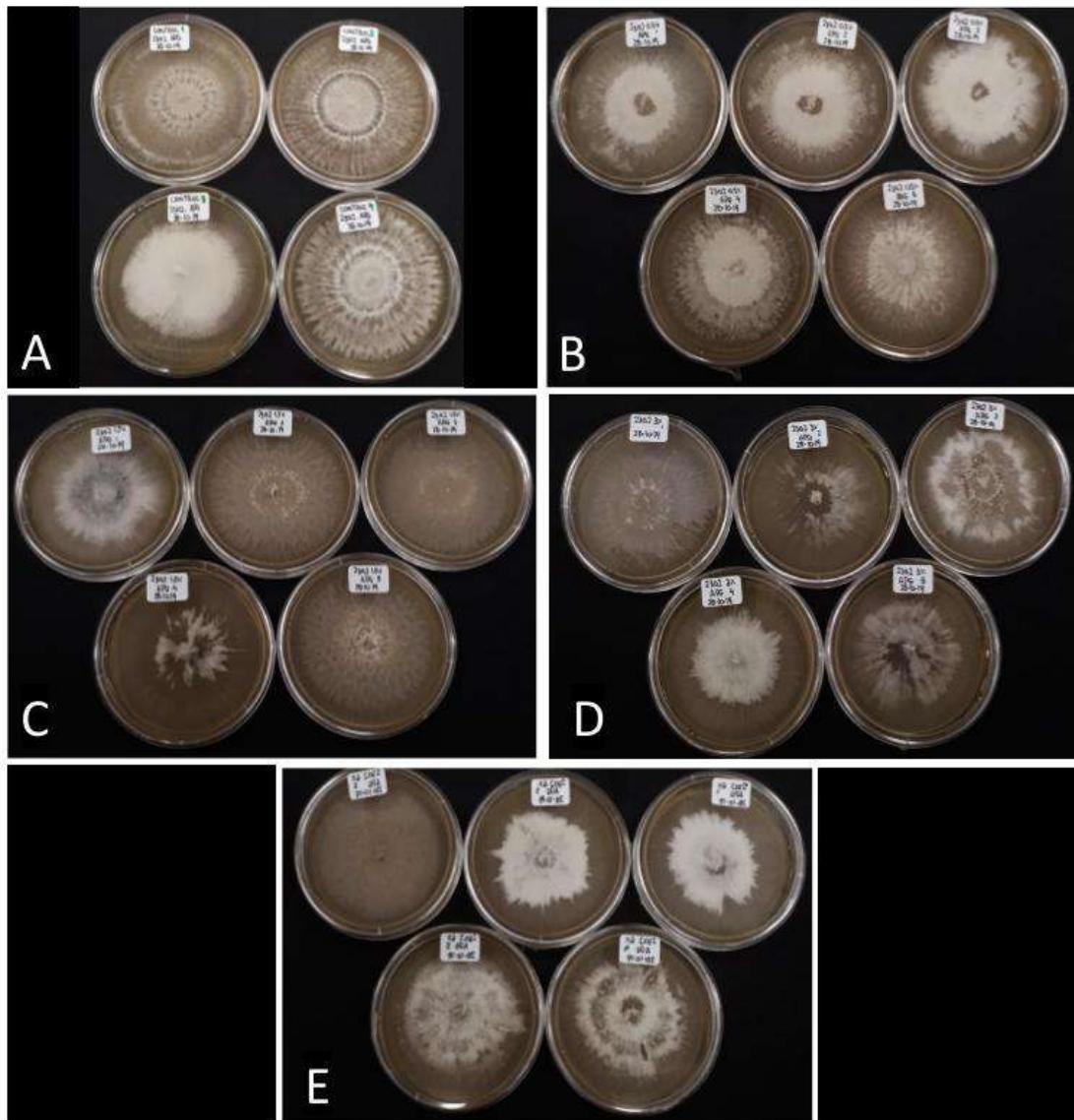


Fig. 2.16. Cultivos de *Microdochium bolleyi* (cep 23A2) en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo preliminar. A. Control. B. 0.5%. C. 1.5%. D. 3%. E. 6%.

En el caso de *S. terrestris*, el crecimiento de la colonia disminuyó al exponerse a concentraciones crecientes de exudados de *Epichloë* en comparación con el control, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo ($F=1.34$; $p=0.29$) (Fig. 2.17). Sin embargo, probablemente debido a la interacción significativa con el factor días de crecimiento ($F=2.3310$; $p=0.0003$), se observan diferencias significativas entre algunos tratamientos (Fig 2.18; Fig 2.19).

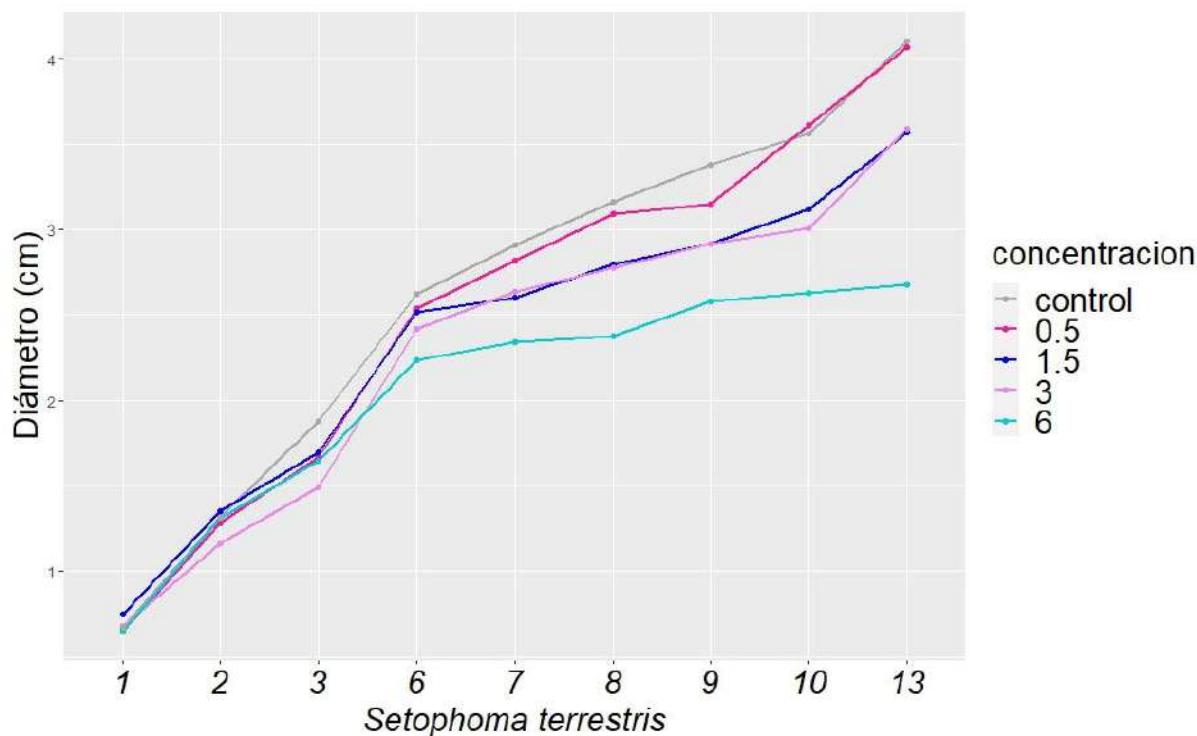


Fig. 2.17. Curvas de crecimiento de *Setophoma terrestris* (cepa 53) cultivada en medio AEM suplementado con concentraciones del 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) de exudados de *Epichloë platensis*.

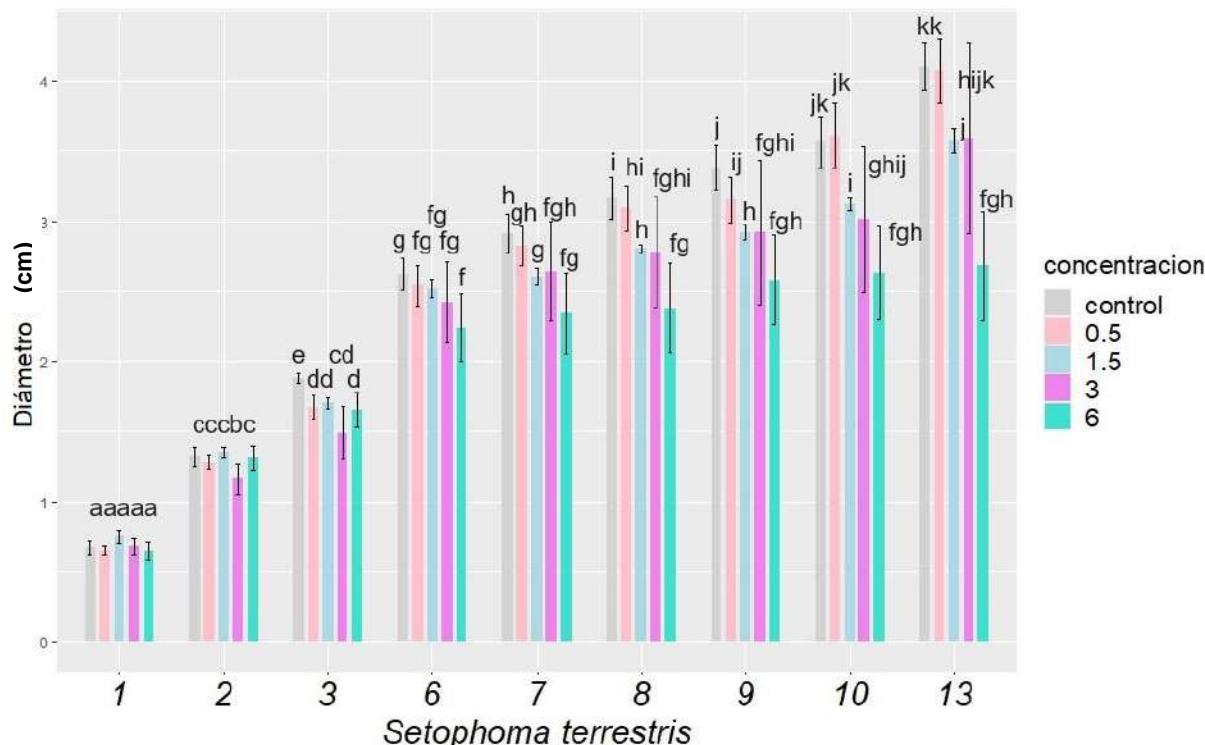


Fig 2.18. Diámetro promedio (en cm) de colonias de *Setophoma terrestris* (C53) en diferentes tiempos de incubación en AEM con el agregado de diferentes concentraciones de exudados (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) obtenidos de *Epichloë platensis*. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 5$).

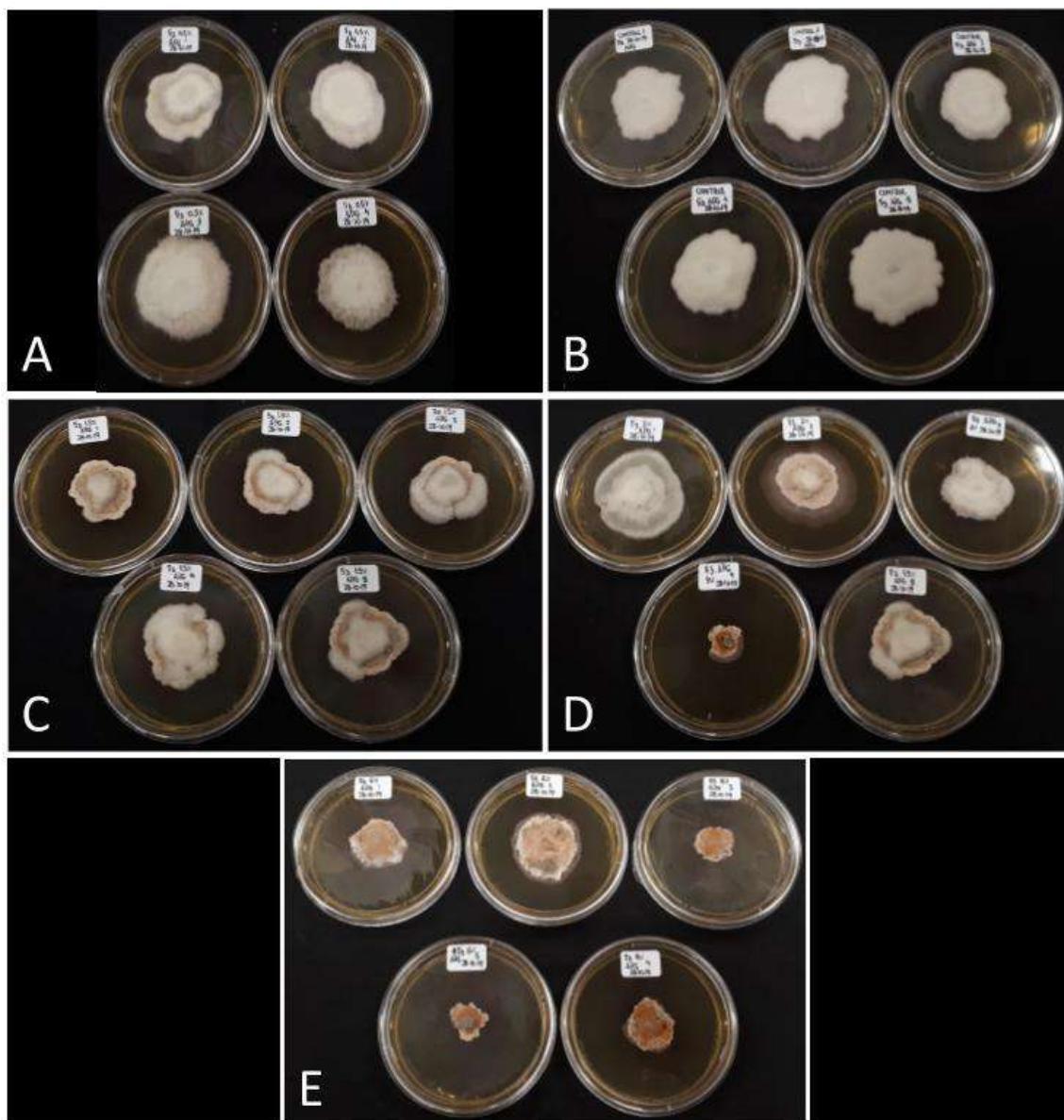


Fig. 2.19. Cultivos de *Setophoma terrestris* (cepa 53) en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo preliminar. A. Control. B. 0.5%. C. 1.5%. D. 3%. E. 6%.

Ensayo principal

Las cepas estudiadas presentaron diferentes patrones de crecimiento.

En el caso de *M. bolleyi*, el modelo que mejor explica la variabilidad correspondió al aditivo, donde se observó un efecto significativo en el crecimiento debido a la concentración de los exudados ($F= 3.99$; $p= 0.028$). A diferencia del ensayo

preliminar, en este ensayo, se ve que los mayores valores de diámetro para esta cepa se obtienen con la concentración de 0.5% de exudados, que muestra los mayores valores en los días 8, 10 y 12. Sin embargo, probablemente debido a la variabilidad de las muestras, no es significativamente mayor que al control (**Fig 2.20 y Fig 2.21**).

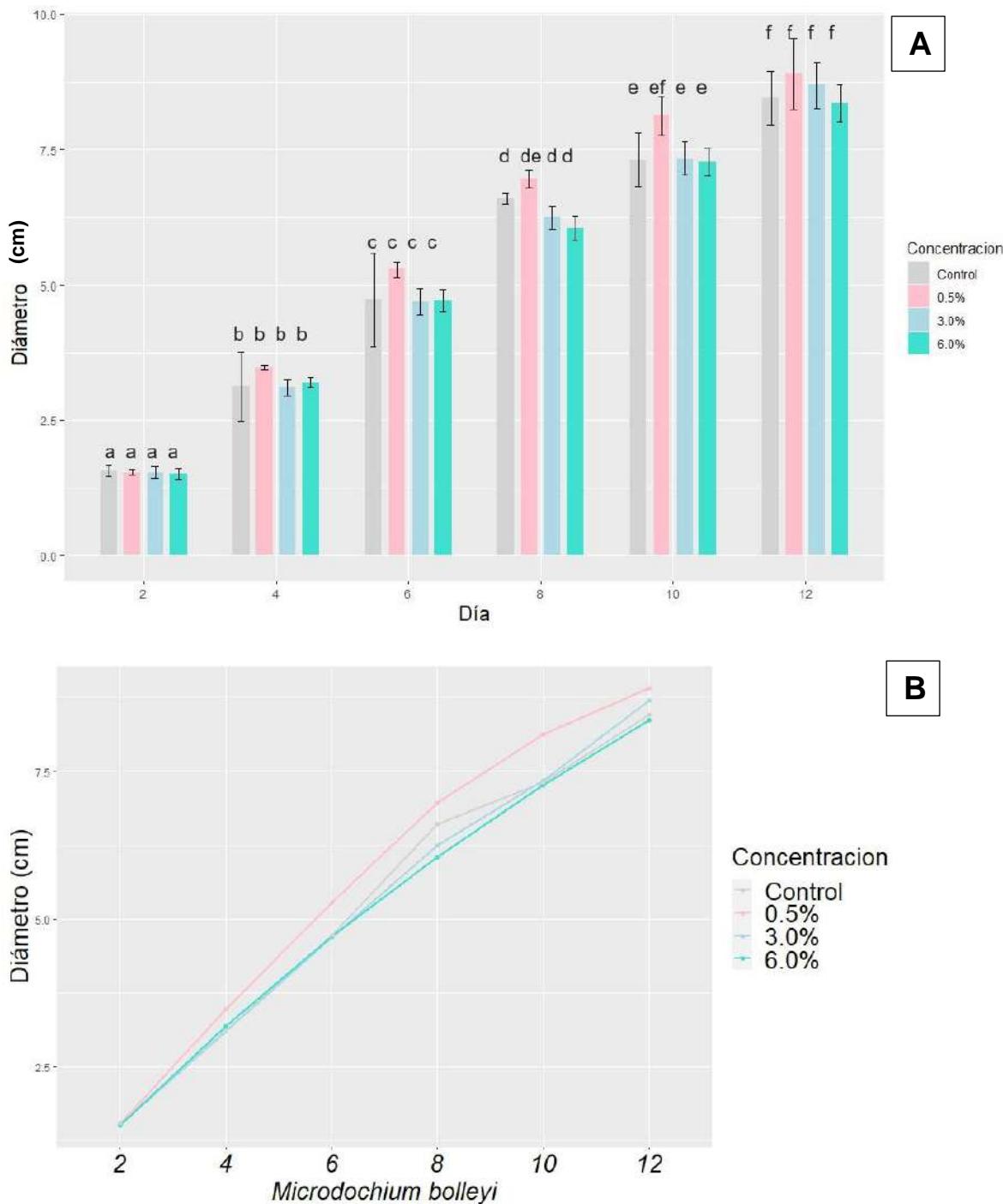


Fig. 20.2. Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *M. bolleyi* (C23A2) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *M. bolleyi* a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).

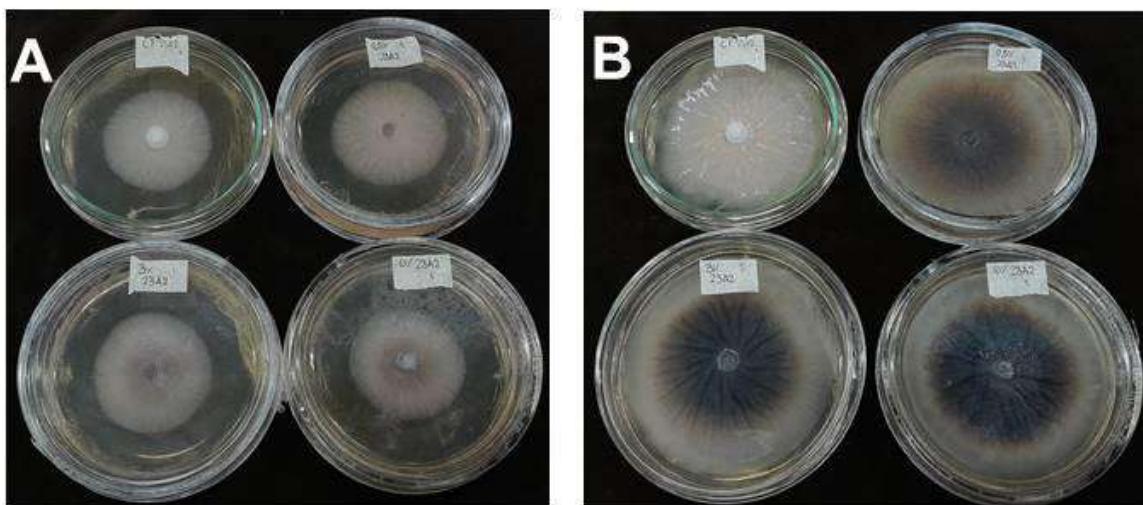


Fig 2.21. Cultivos de *M. bolleyi* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo principal. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 6 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 12 de crecimiento.

Thelonectria blackeriella

El modelo que mejor describe la variabilidad es el modelo aditivo. Dado que no se corroboraron los supuestos, se ajustó la varianza utilizando VarIdent, aunque el mejor ajuste se obtuvo aplicando una transformación logarítmica a la variable. Se detectó un aumento significativo en el diámetro de la colonia en función de la concentración de los exudados ($\chi^2= 47.84$; $p=2.294^{e-10}$). Las concentraciones de 0.5 y 6% presentaron valores significativamente mayores en comparación al control (Fig 2.22 A). A partir del día 14, las cajas sometidas a la concentración 3% de exudados comenzaron a presentar una disminución en la velocidad de crecimiento, presentando valores cercanos a los del tratamiento control (Fig 2.22 B; Fig 2.23).

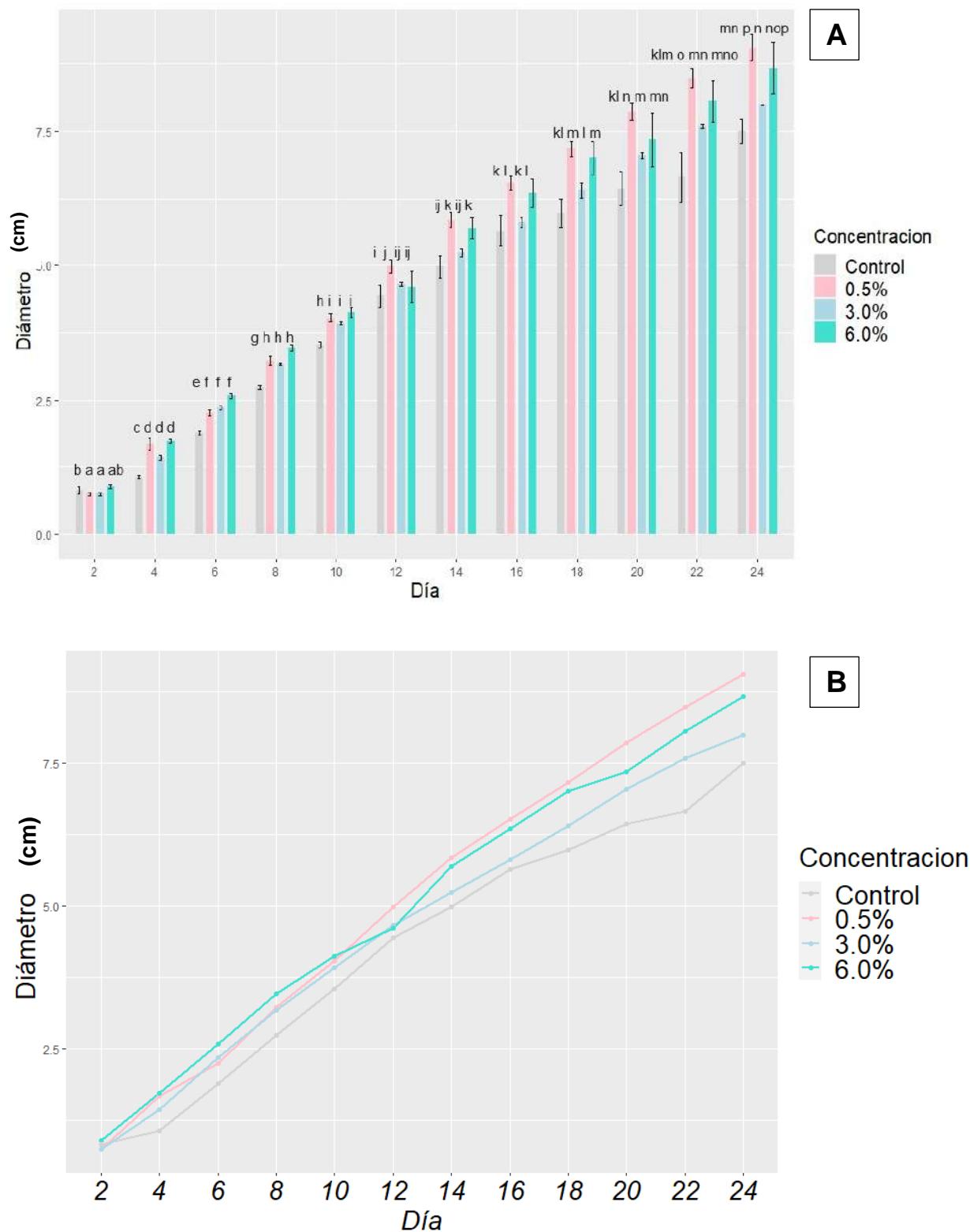


Fig. 2.22. Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *T. blackeriella* (C71A) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *Thelonectria blackeriella* (C71A) a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 5$).

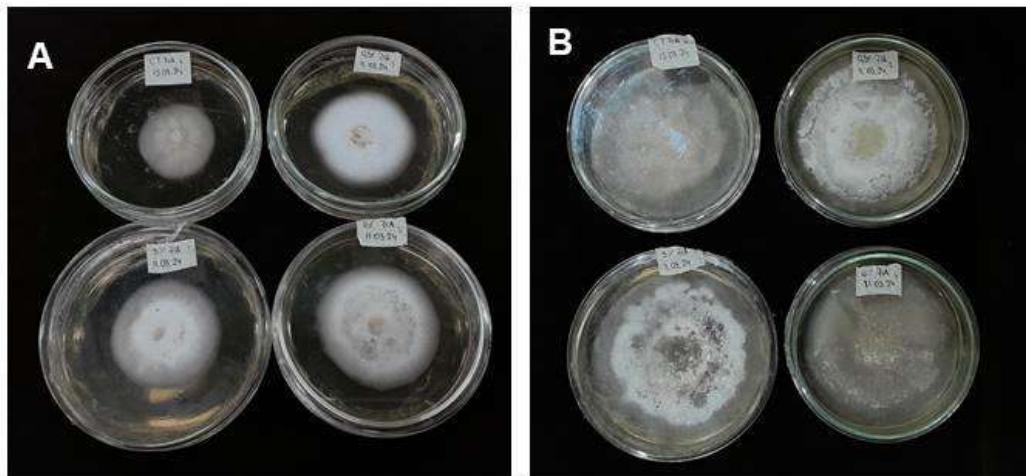


Fig 2.23. Cultivos de *T. blackeriella* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 14 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 24 de crecimiento.

***Herpotrichia* sp.**

Al igual que en el caso de *T. blackeriella*, el modelo que mejor describió la variabilidad fue el modelo aditivo, y los datos obtenidos para la cepa de *Herpotrichia* no corroboraron los supuestos. El mejor ajuste se obtuvo como resultado de la transformación logarítmica de la variable. En este caso, los diámetros de las colonias fueron afectados significativamente por la concentración de los exudados ($\chi^2=279.28$; $p< 2.2e-16$), mostrando los mayores valores las colonias cultivadas en cajas con exudados al 6% (Fig 2.24 A). Esta fue prácticamente la única concentración donde las colonias alcanzaron diámetros significativamente mayores que el control. En relación a las curvas de crecimiento, esta cepa muestra una respuesta de crecimiento constante a lo largo del tiempo (Fig 2.24 B; Fig 2.25).

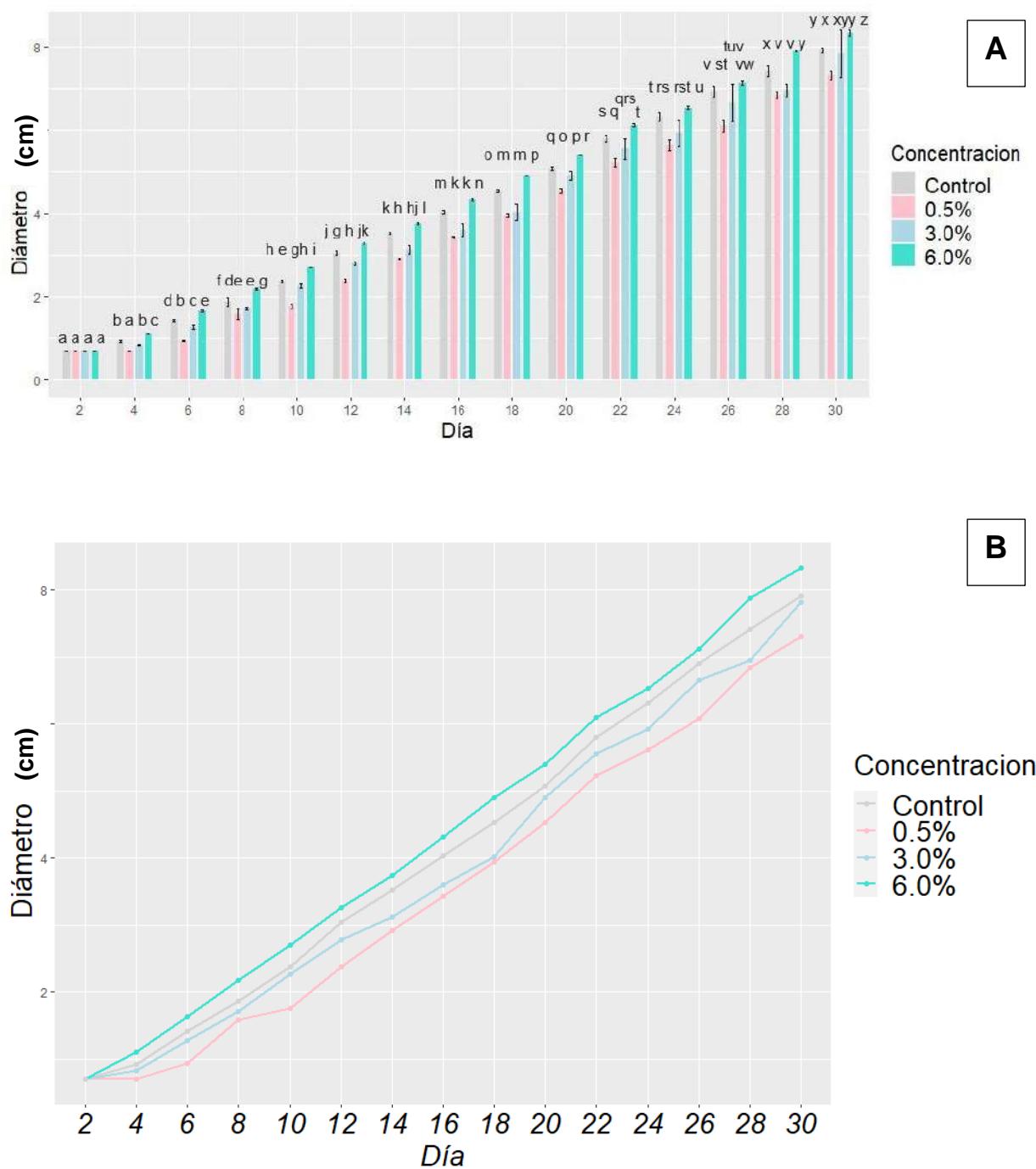


Fig. 2.24. Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *Herpotrichia* sp. (CG5B) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *Herpotrichia* sp. a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 5$).

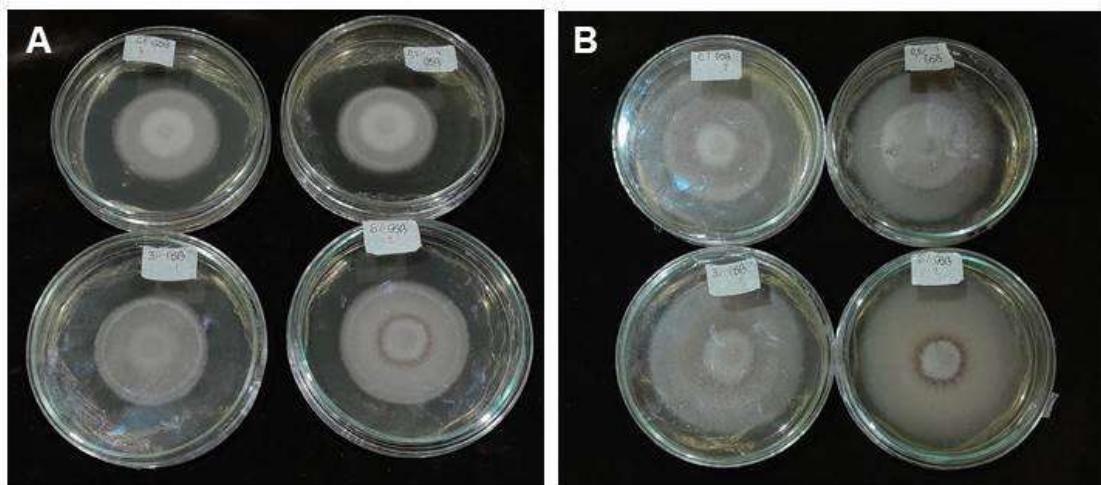


Fig 2.25. Cultivos de *Herpotrichia* sp. en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 20 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 30 de crecimiento.

Setophoma terrestris

Al igual que en los casos de *T. blackeriella* y la cepa de *Herpotrichia*, el modelo aditivo fue el que mejor describió la variabilidad. Los datos no corroboraron los supuestos, y el mejor ajuste se obtuvo mediante una transformación logarítmica de la variable. En este caso, los diámetros de las colonias fueron afectados significativamente por la concentración de los exudados ($F=17.68$; $p<0.0001$), mostrando los menores valores las colonias cultivadas con exudados al 6%. Las colonias cultivadas con exudados al 0.5 % y 3% no mostraron diferencias con el control en cada fecha de medición. Sin embargo, las colonias con exudados al 6% alcanzaron diámetros significativamente menores que el control desde el día 4 de crecimiento y esta diferencia se acentuó con el tiempo. Esta tendencia se observa claramente en el gráfico (**Fig 2.26 A; B**) y es similar a la obtenida en el ensayo preliminar para esta cepa (**Fig 2.27**).

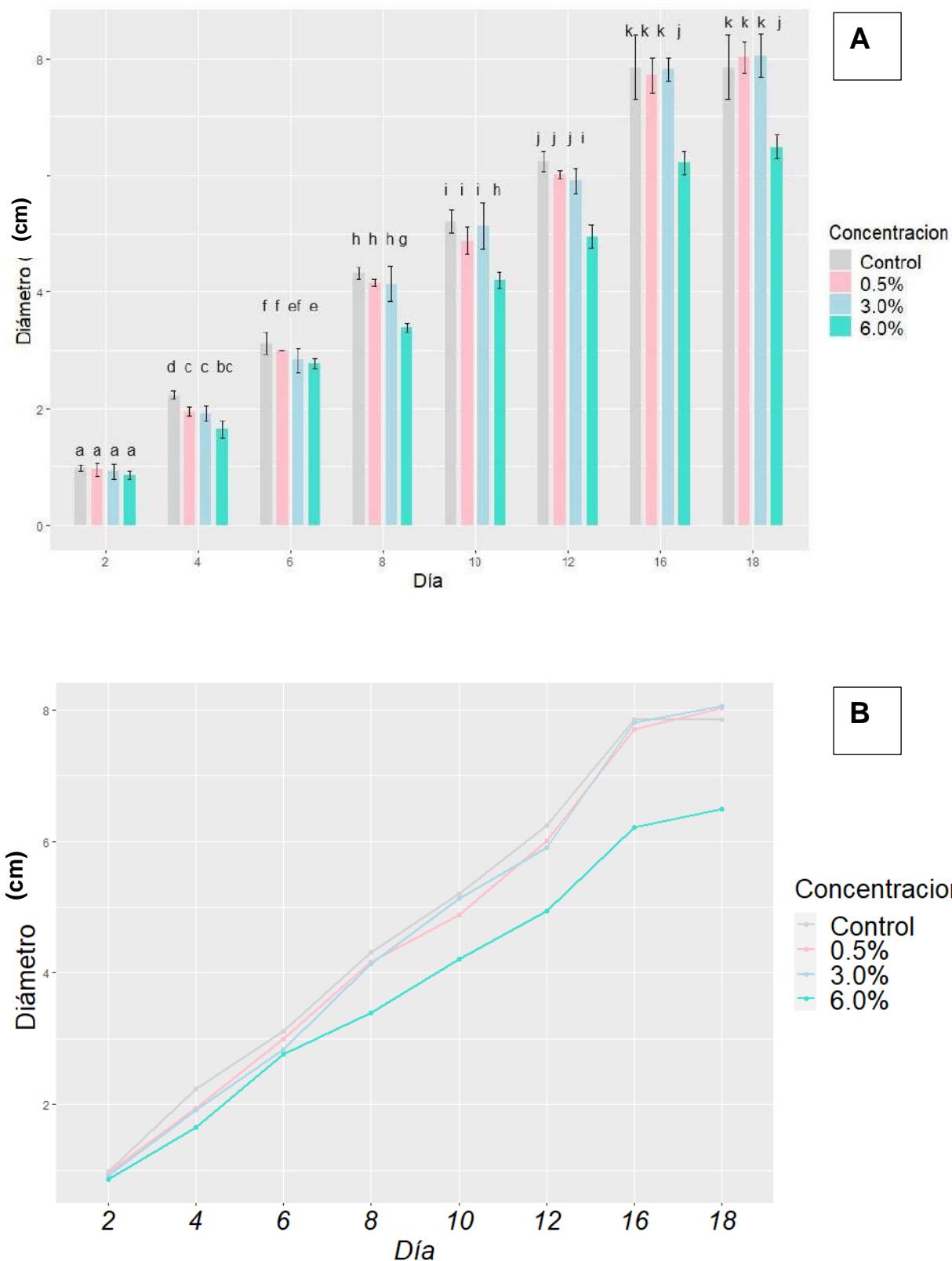


Fig. 2.26. Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *Setophoma terrestris* (C53) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *Setophoma terrestris* a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 5$).

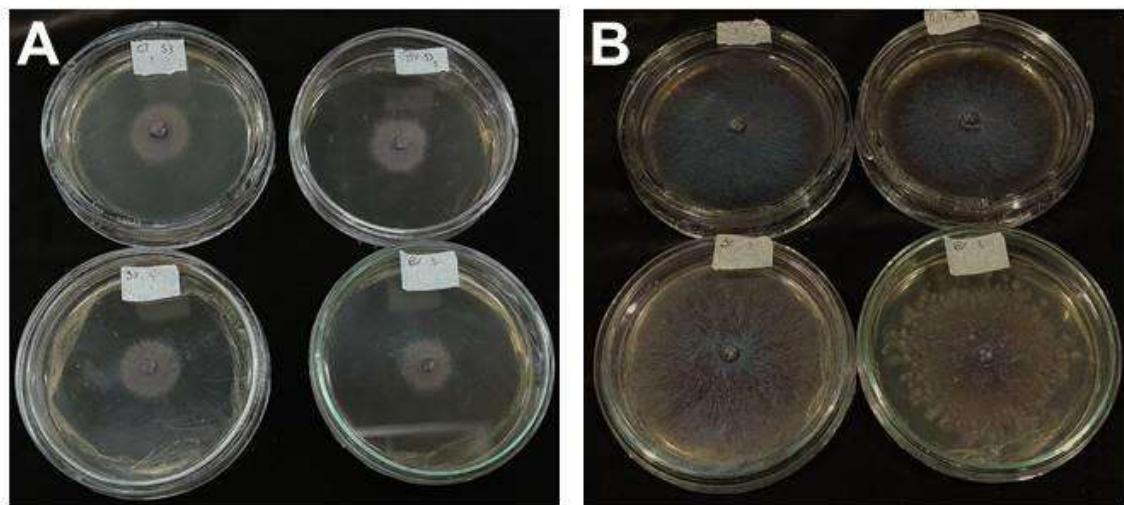


Fig 2.27. Cultivos de *S. terrestris* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 6 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 18 de crecimiento.

Poaceascoma helicoides

Al igual que en el caso de todas las cepas estudiadas, el modelo que mejor describió la variabilidad de *P. helicoides* fue el modelo aditivo, y los datos obtenidos para la cepa sí corroboraron los supuestos. En este caso, los diámetros de las colonias no fueron afectados significativamente por la concentración de los exudados ($F=1.39$; $p=0.28$). Sin embargo, probablemente debido a la existencia de interacción significativa entre los factores día de observación y concentración de exudados, se detectaron diferencias significativas entre algunas concentraciones para algunos de los días de medición. A partir del día 8, se observa que las colonias cultivadas con agregado de exudados presentan diámetros inferiores al control, siendo más pronunciado para las concentraciones de 3% y 6% (Fig 2.28 A). En el gráfico (Fig 2.28 B) se observa que las curvas de crecimiento mantienen una pendiente similar hasta el día 8, cuando comienzan a evidenciarse las diferencias entre los tratamientos (Fig 2.29).

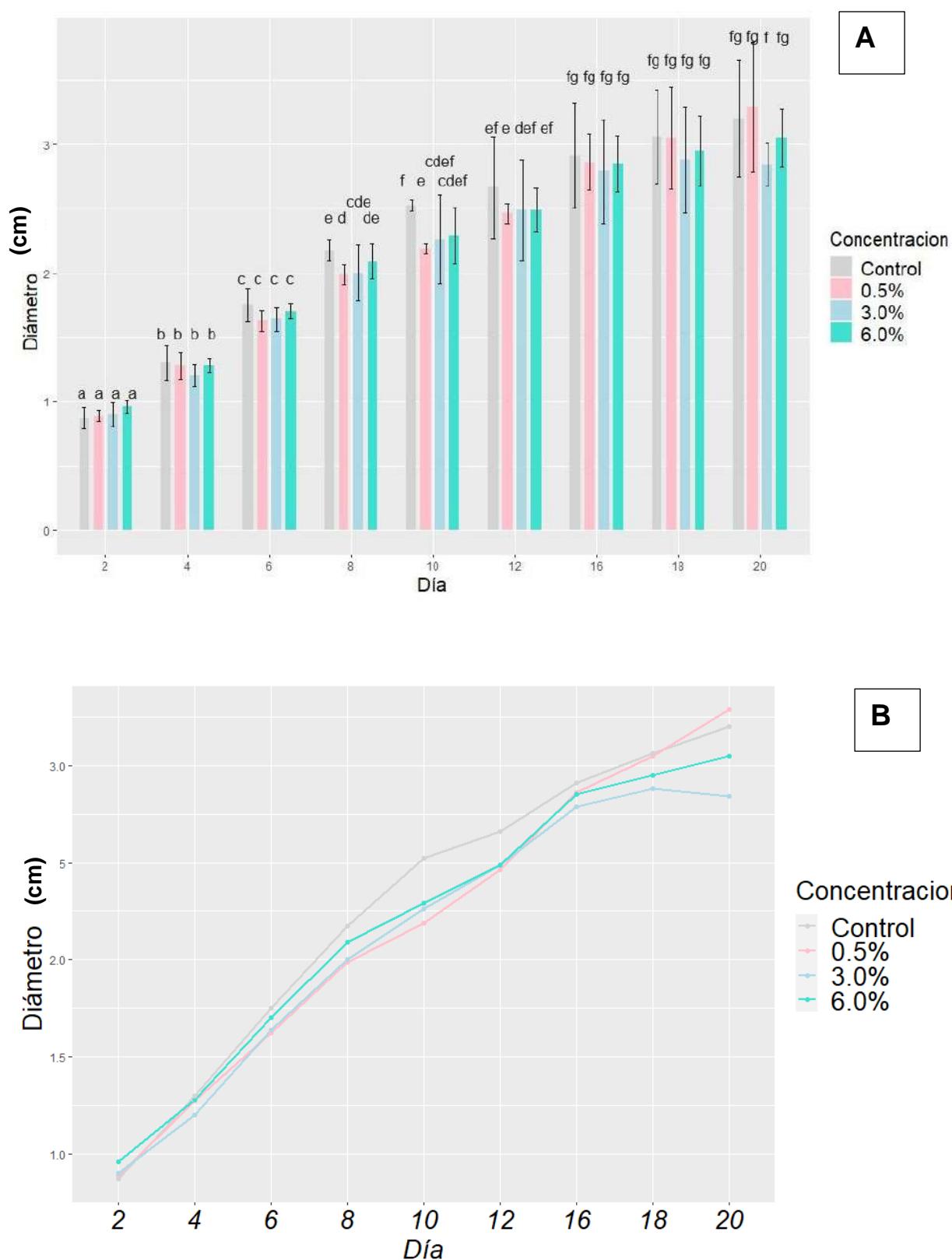


Fig. 2.28. Ensayos de evaluación del efecto de diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis* (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v)) sobre el crecimiento de *P. helicoides* (CE8) **A.** Diámetro promedio (en cm) de colonias y **B.** Curvas de crecimiento de *P. helicoides* a diferentes tiempos de incubación en AEM. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 5$).

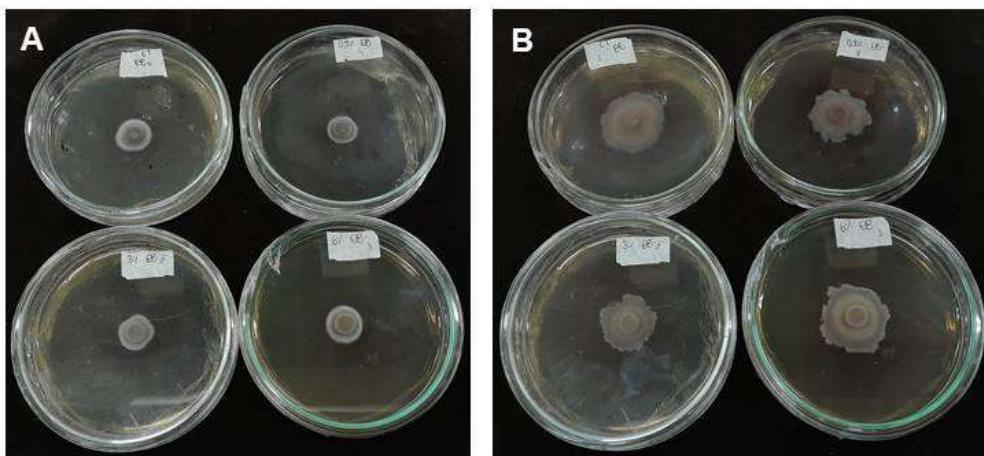


Fig 2.29. Cultivos de *Poaceascoma helicoides* en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados. **A.** Cultivos al día 6 de crecimiento. **B.** Cultivos al día 20 de crecimiento.

Al comparar todas las cepas en el día 12 para facilitar la visualización de los patrones de comportamiento (**Fig 2.30**), no es posible realizar comparaciones directas de los valores absolutos debido a las diferencias en el crecimiento intrínsecas a cada cepa. Sin embargo, este enfoque permite identificar en qué cepas se observa una promoción o inhibición del diámetro de la colonia debido a los exudados (**Fig 2.31**).

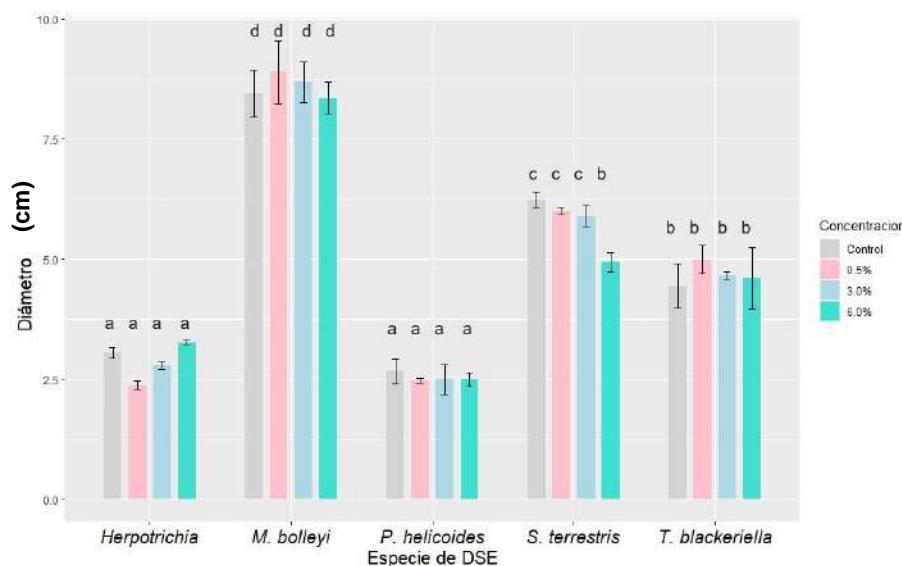


Fig. 2.30. Diámetro promedio (en cm) de colonias de *Herpotrichia* sp.(CG5B), *Microdochium bolleyi* (C23a2), *Poacerascoma helicoides* (CE8), *Setophoma terrestris* (C53) y *Thelonectria blackeriella* (C71A) al día 12 de incubación en AEM con el agregado de diferentes concentraciones de exudados (0%, 0.5%, 1.5%, 3% y 6% (v/v) obtenidos de *Epichloë plantesis*. Los valores representan la media ± error estándar (n = 5).

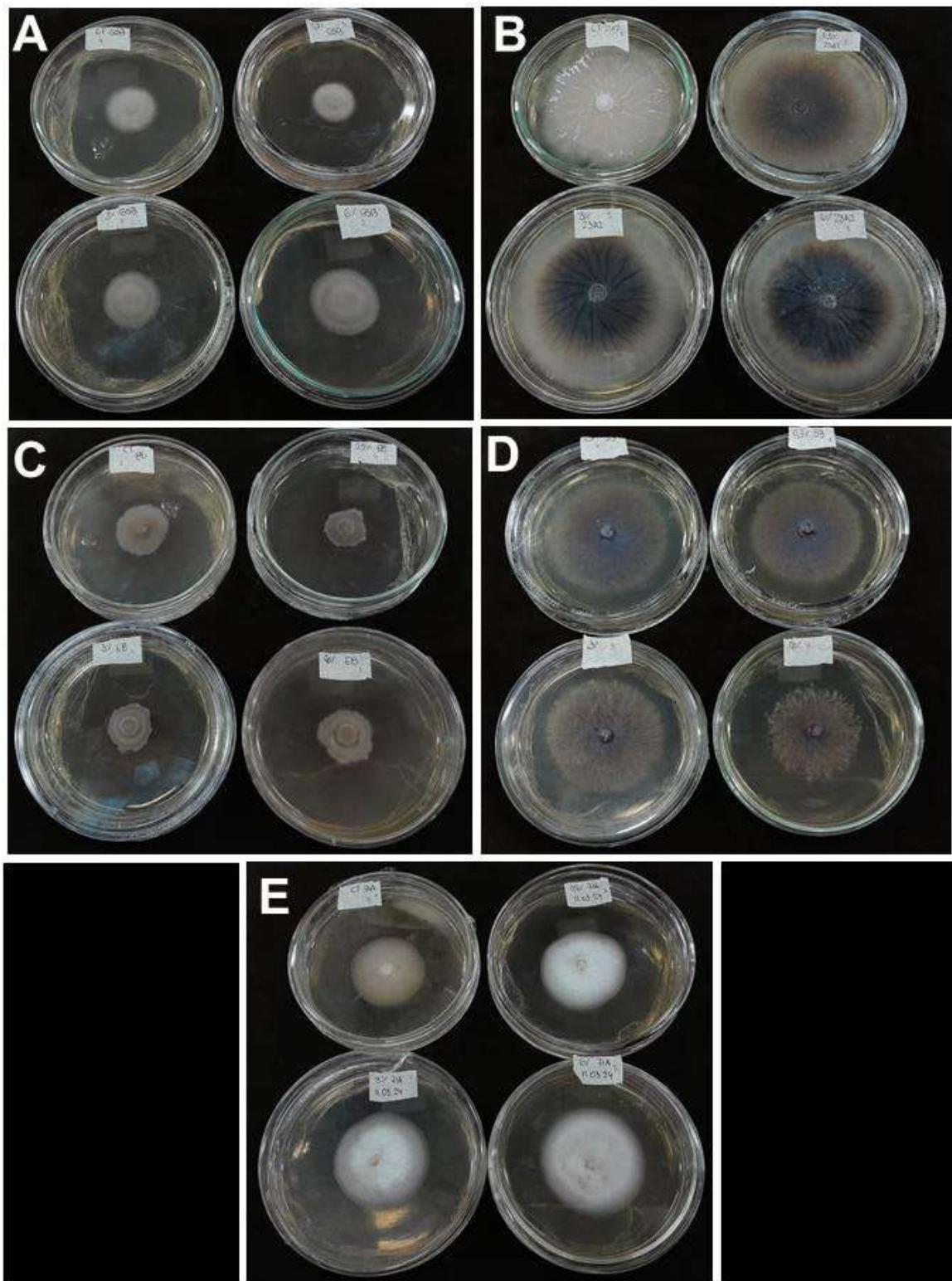


Fig 2.31. Cultivos de **A.** *Herpotrichia* sp., **B.** *Microdochium bolleyi*, **C.** *Poaceascoma helicoides*, **D.** *Setophoma terrestris*, **E.** *Thelonectria blackeriella*, al día 12 de crecimiento en medio AEM suplementado con diferentes concentraciones de exudados de *Epichloe platensis*. Ensayo definitivo. De izquierda a derecha: arriba, Control, sin exudados y 0.5% de exudados; abajo 3% y 6% de exudados.

Evaluación del efecto de una cepa de *Setophoma terrestris* sobre plantas adultas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë*.

Parámetros de crecimiento de las plantas

Al momento de la cosecha, se examinó el estado general de las plantas y se observó una coloración rosada en las raíces, característica de la podredumbre basal, sin embargo no se encontraron lesiones necróticas. (Fig 2.32).

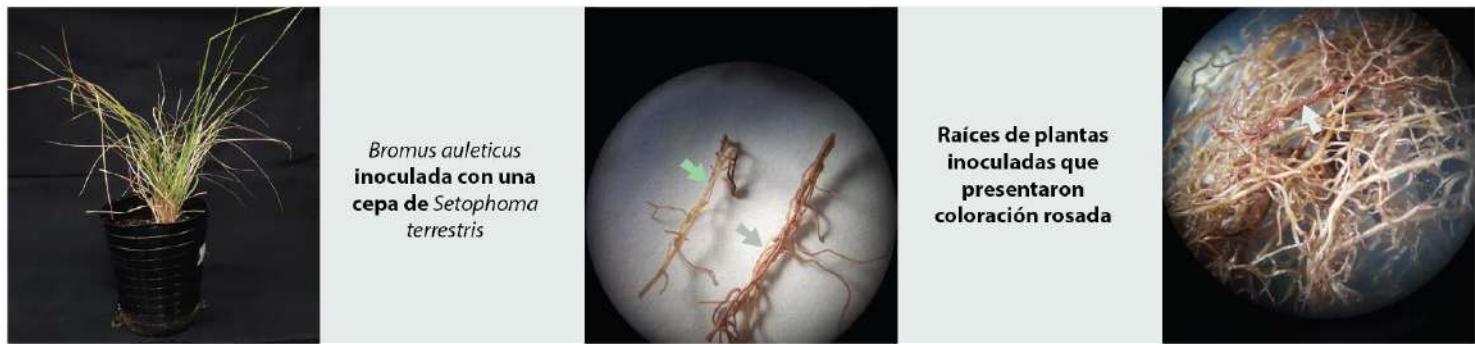


Fig 2.32. Evaluación del estado general de la planta de *Bromus auleticus* inoculada con *Setophoma terrestris* (S+). Observación de síntomas en las raíces. Flecha gris, corresponde raíces con coloración rosada en plantas S+. Flecha verde, corresponde a raíz presencia de síntoma.

En cuanto al peso seco del vástago, las plantas E-S+ mostraron los valores más altos, significativamente diferentes del resto de los tratamientos debido al efecto del factor *S. terrestris* ($F=5.12$, $p= 0.04$). El resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí. No se detectó un efecto significativo de *Epichloë* ($F=0.002$, 0.96), ni una interacción significativa entre los factores ($F=2.77$, $p=0.12$) (Fig. 2.33)

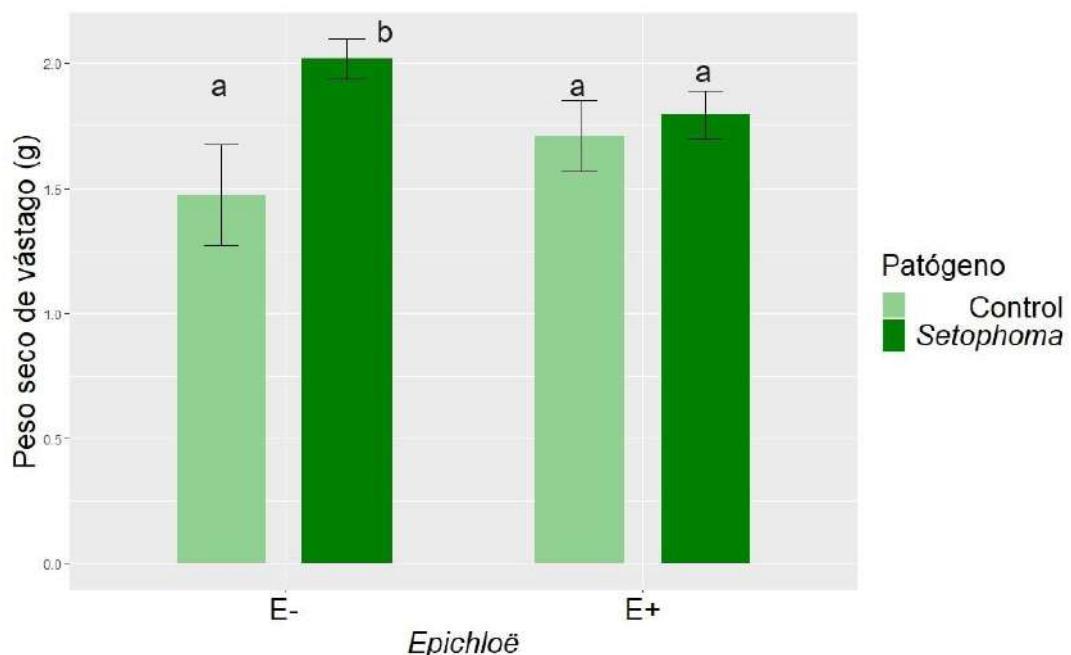


Fig. 2.33. Peso seco de vástago de plantas de 4 meses de edad de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas o no con la cepa 53 de *Setophoma terrestris* (*Setophoma* y Control, respectivamente).

Para el peso seco de la raíz, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos debido a *S. terrestris* ($F=1.62$, $p=0.21$) o *Epichloë* ($F=0.74$, $p=0.4$), ni se detectó una interacción significativa entre ambos factores ($F=1.44$, $p=0.25$). Cabe destacar que tanto el peso del vástago como el de raíz mostraron tendencias similares, con el tratamiento E-S- presentando los valores más bajos en ambos casos (**Fig. 2.34**)

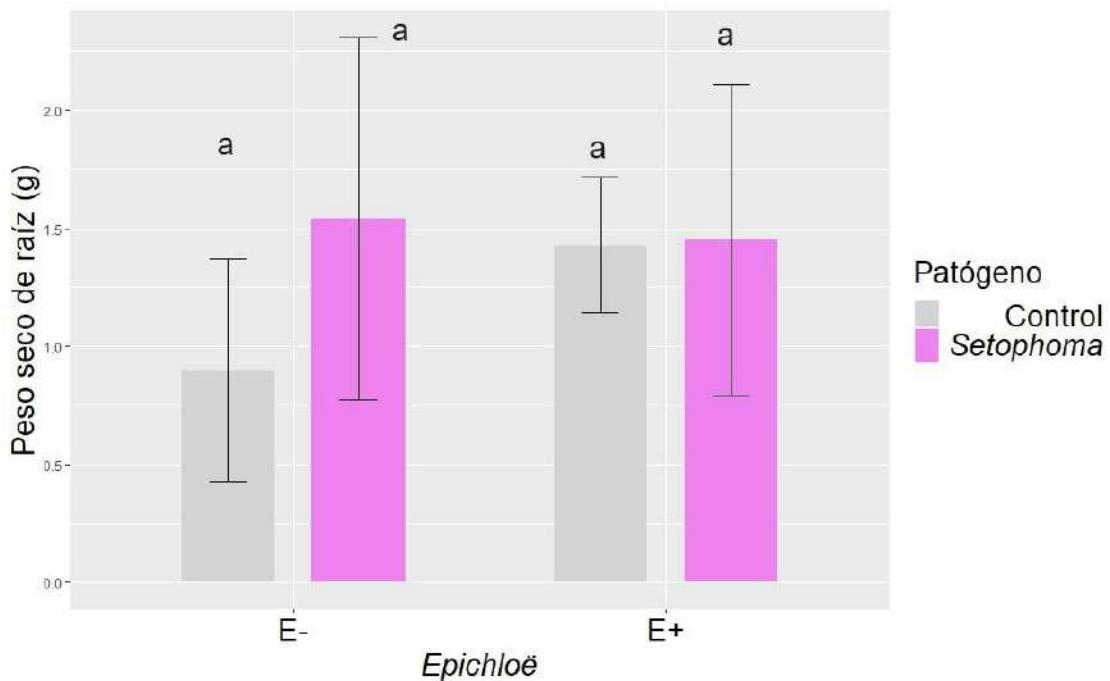


Fig. 2.34. Peso seco de raíz de plantas de 4 meses de edad de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas o no con la cepa 53 de *Setophoma terrestris* (*Setophoma* y Control, respectivamente).

El largo de las hojas más largas fue similar entre todos los tratamientos, como lo indica la falta de un efecto significativo de *S. terrestris* ($F=0.065$, $p=0.8$) y de *Epichloë* ($F=0.08$, $p=0.78$), así como la ausencia de una interacción significativa entre los factores ($F=0.85$, $p=0.37$) (Fig. 2.35).

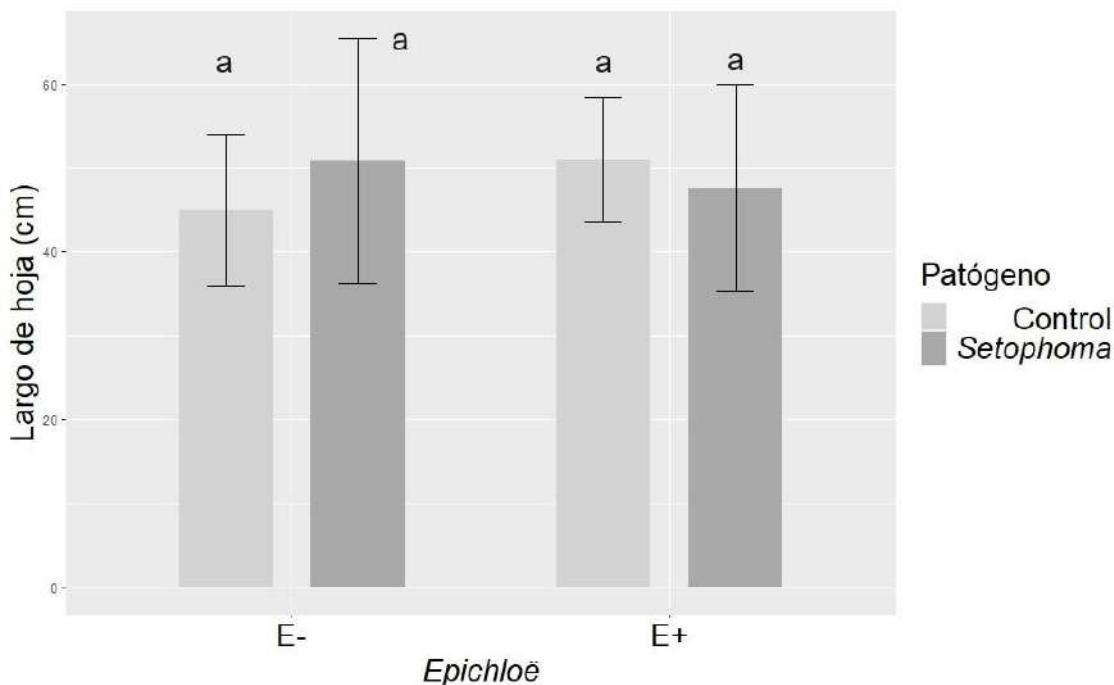


Fig. 2.35. Largo de hojas (cm) de plantas de 4 meses de edad de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas con la cepa 53 de *Setophoma terrestris* (*Setophoma*) o no (Control).

Colonización de raíces

Las estructuras del DSE analizadas, fueron observadas en plantas de todos los tratamientos, aunque con distinta frecuencia, y variaciones en su comportamiento según el tratamiento con *Epichloë*. En el análisis se incluyó el tratamiento S- (sin inoculación de *S. terrestris*) dado que algunas estructuras fueron detectadas en este tratamiento. Sin embargo, la frecuencia en el tratamiento S- fue significativamente menor en comparación con los tratamientos donde sí se inoculó la cepa de *S. terrestris*, indicando una inoculación exitosa. Dado que el objetivo del ensayo fue evaluar el efecto de *Epichloë* sobre la colonización de *S. terrestris* (C53), solo brindamos los datos correspondientes a *Epichloë*.

Hifas septadas hialinas

Se observó presencia de HSH en plantas de todos los tratamientos, siendo esta la estructura de mayor abundancia (**Fig. 2.36**). El análisis reveló que *Epichloë* no tuvo ningún efecto significativo sobre el desarrollo de estas estructuras ($Lrt=2.05e-05$, $p=0.99$). Las plantas S+ presentaron una abundancia significativamente mayor que las S-, independientemente del estatus de *Epichloë* ($Lrt= 12.44$, $p=0.0004$). Además, la interacción entre ambos factores resultó ser significativa ($Lrt=12.87$, $p=0.005$).

Hifas septadas oscuras

Las hifas septadas oscuras se encontraron en menor proporción que las HSH (**Fig. 2.36**). La asociación con *Epichloë* tuvo un efecto positivo y significativo en la colonización por HSO ($Dev= 69.43$, $p=2e-16$), siendo esta colonización tres veces superior en S+E+, que en S+E-. También se detectaron diferencias significativas en la abundancia de HSO debido a la inoculación con *S. terrestris* ($Dev=136.7$, $p=p=2e-16$). La interacción entre los factores no fue significativa ($Dev=0.73$, $p=0.39$).

Microesclerocios

Se encontraron microesclerocios en plantas de todos los tratamientos analizados, con una abundancia significativamente mayor en el tratamiento donde se inoculó la cepa de *S. terrestris* ($LRT=11.03$, $p=0.0009$). Aunque no se observó un patrón claro, su abundancia fue menor en comparación con las HSH y las HSO, siendo el menor valor registrado en plantas E-. No se observaron efectos significativos asociados con el estatus endofítico de *Epichloë* ($LRT=0.033$, $p= 0.85$); sin embargo, la interacción entre los factores fue significativa ($LRT=12.52$, $p=0.006$).

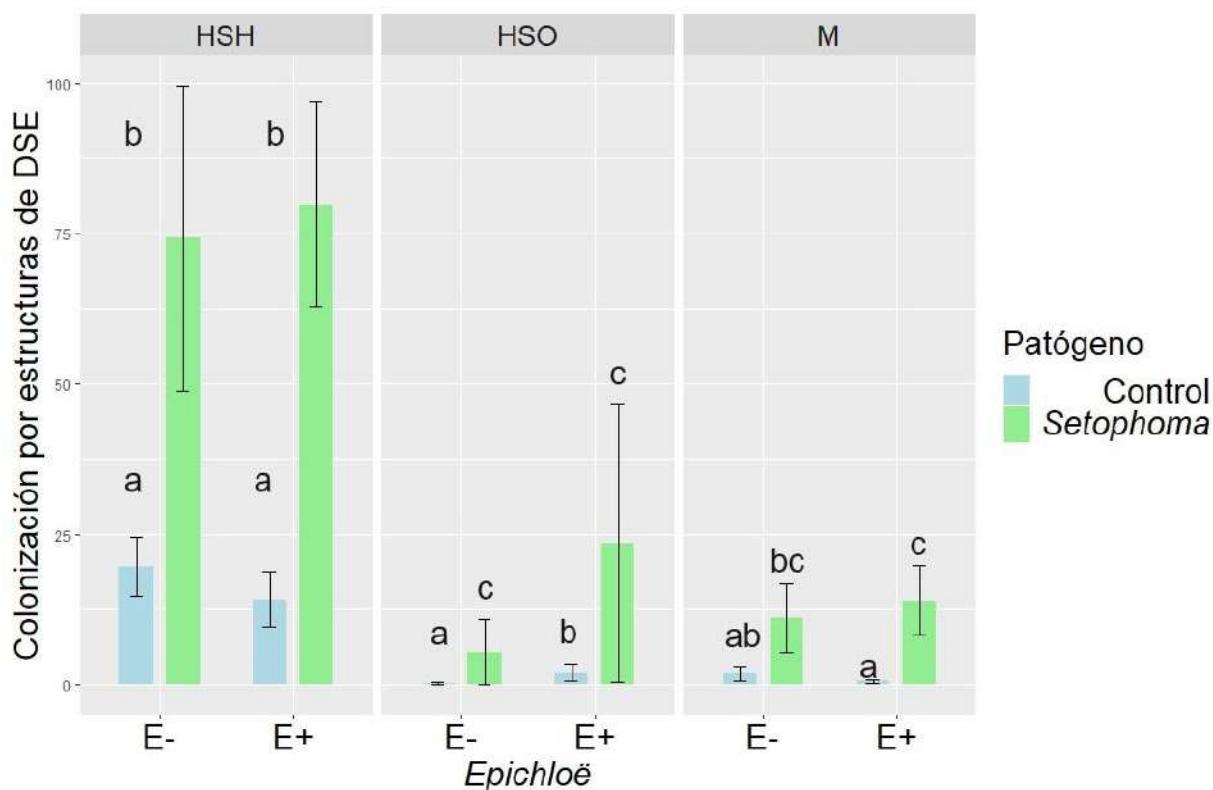


Fig. 2.36. Colonización de raíces de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), por estructuras características de DSE, inoculadas o no con *S. terrestris* 53 (Setophoma y Control respectivamente). HSH: hifas septadas hialinas, HSO: Hifas septadas oscuras, M: Microesclerocios. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE). Las letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada variable analizada.

DISCUSIÓN

Solubilización de P

- Evaluación de cepas solubilizadoras de P en medio NBRIP sólido

Los microorganismos endofitos de raíz y asociados a la rizósfera que muestran algún papel en el ciclo de P mineral presentan la ventaja de que este papel afectará la nutrición de la planta en forma más directa, por otra parte, serán influenciados por los exudados radicales capaces de impulsar la producción de metabolitos, como ácidos orgánicos, involucrados en la solubilización de P y además pueden presentar capacidades adicionales que potencien su papel en la salud de la planta tales como mejorar la absorción de nutrientes, antagonizar con patógenos o alterar la arquitectura de la raíz, controlando directamente los patógenos o estimulando los mecanismos de defensa de las plantas (Chamkhi *et al.*, 2022). En este estudio, se trabajó con cepas de DSE aisladas de raíces de plantas de *Bromus auleticus* asociadas (E+) o no (E-) a *Epichloë platensis*. A partir de un screening en medio sólido, se seleccionaron 6 cepas con capacidad de solubilizar P, identificadas por la presencia de un halo de solubilización alrededor de la colonia. Según la identificación molecular realizada en el Capítulo 1, estas corresponden a *Thelonectria blackeriella* (C71A), *Magnaportheopsis* sp. (C63), *Microdochium bolleyi* (C51), *Herpotrichia* sp. (G5B), *Tetraplosphaeria* sp. (CB4) y *Poaceascoma helicoides* (CE8). Aún más, se han aislado cuatro cepas de *M. bolleyi*, dos de *Herpotrichia* sp. y dos de *P. helicoides*, y los resultados han mostrado que sólo algunas tienen la capacidad de solubilizar P, siendo esto consistente con los antecedentes. Esto evidencia una variabilidad en las capacidades de solubilización de P entre diferentes especies y cepas de una misma especie, destacando la importancia de caracterizar cada cepa de forma individual.

Estas cepas fueron aisladas de plantas E+ y E-, tres de cada tipo, de un total de 29 cepas. Existen antecedentes en el modelo de estudio *B.auleticus-Epichloë* en los cuales se evaluó la diversidad de hongos solubilizadores de P asociados a la rizósfera de plantas E+ y E-. Aunque, no se encontraron diferencias significativas en el número de HSF entre plantas de ambos estatus endofíticos, sí se observó una mayor diversidad de HSF asociados a la rizósfera de plantas E+ (Arrieta *et al.*, 2015). En este estudio, la proporción de cepas DSE con capacidad para solubilizar P fue baja, cercana al 20% (6/29), sin diferencias significativas entre plantas E+ y E-, en

concordancia con lo mencionado. Además, todas pertenecieron a diferentes géneros, lo que habla de la heterogeneidad de las cepas de DSE con esta capacidad, en particular, asociadas a *B. auleticus* y aunque fueron solo 6 cepas, 3 aisladas de plantas E+ y 3 de plantas E-, el estatus de la planta no parece tener efecto en la presencia de DSE solubilizadores.

En Argentina existen estudios sobre cepas de DSE aisladas de distintas gramíneas, que presentaron variabilidad en su capacidad de solubilizar diferentes fuentes de P (TCP, FA, FF) (Spagnoletti *et al.*, 2017; Barresi *et al.*, 2022; Echeverría *et al.*, 2024). Mientras que Echeverría *et al.*, (2024) aislaron una cepa de DSE a partir de plantas de cebada identificada como *Microdochium* sp. capaz de solubilizar P especialmente a partir de TCP y presentar una alta tasa de crecimiento, incluso a un pH ácido, Rothen *et al.*, (2018) caracterizaron la fisiología de una cepa de *Microdochium bolleyi*, la cual no presentó capacidad de solubilización de P en presencia de la misma fuente.

Se destaca a las cepas de *T. blackeriella*, *Magnaportheopsis* sp. y *Herpotrichia* sp. que presentaron capacidad para solubilizar P dado que, a nuestro conocimiento, no hay registros previos sobre estas especies. Este resultado representa un hallazgo prometedor que amplía el conocimiento sobre la funcionalidad de estos endofitos

- Cuantificación de la solubilización de P

Se realizaron ensayos de solubilización de P en medio líquido, con distintas fuentes de P (TCP, FA, FF) utilizando la cepa de *T. blackeriella*. En general, el TCP es más soluble que el FA, y este último es más soluble que el FF (Sims y Sharpley, 2005). En nuestro estudio, *T. blackeriella* mostró la capacidad diferencial de solubilizar distintas fuentes de P. Siendo significativamente mayor para FA y TCP respecto de FF. Sin embargo, como se ha mencionado, la ausencia de un valor basal de solubilización limita el análisis y obliga a interpretar los datos como orientativos. A pesar de esto, los resultados se asemejan a estudios previos con HSF o bien DSE, en los cuales se evidenció capacidad diferencial según la fuente de P. Tanto Scervino *et al.*, (2010) como Stefanoni Rubio (2019) evaluaron HSF, este último se centró en hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Talaromyces*, todas las cepas evaluadas lograron solubilizar TCP, confirmando que esta fuente no presenta grandes desafíos para los HSF, en comparación a FA, FF y superfosfato simple, un fertilizante ampliamente utilizado en el agro. En lo que respecta a cepas autóctonas de DSE, hay

estudios recientes (Spagnoletti *et al.*, 2017) que han identificado cepas de *Ophiosphaerella*, *Cochliobolus* y *Setosphaeria rostrata* con capacidad para solubilizar TCP en medio sólido, mientras que *Drechslera* y *Ophiosphaerella herpotricha* mostraron mayor solubilización hacia la fuente de FA. Mientras que en medio líquido, las capacidades variaron dependiendo de la fuente de P y del hongo. Echeverría *et al.*, (2024) reportaron cepas de *Exophiala equina* y *Curvularia arcana* con capacidad para solubilizar tanto TCP como FA, aunque esta última fue menos eficiente. Los antecedentes resaltan la variabilidad en la respuesta de los hongos frente a distintas fuentes de P y su fuerte dependencia de la identidad del microorganismo. Según Scervino *et al.*, (2010), en los estudios de solubilización de P no solo es determinante la fuente utilizada, sino también la capacidad del hongo para producir ácidos orgánicos específicos. El ácido glucónico es predominante en la solubilización de TCP, mientras que los ácidos cítrico y valérico son más comunes en la solubilización de FA y FF. Estos hallazgos subrayan que la liberación de diversos ácidos orgánicos en la rizosfera es clave para solubilizar compuestos inorgánicos de P, y que la producción simultánea de varios ácidos puede potenciar esta capacidad. Nuestros resultados son no concluyentes, deberían repetirse los ensayos y dado los antecedentes mencionados, incorporar el estudio de ácidos orgánicos asociados a la cepa seleccionada, en este caso *Thelonectria blackeriella*, para determinar su capacidad para solubilizar fosfatos inorgánico.

Estudio integrado de diversos parámetros de desarrollo, el estatus de la planta de origen y estrategia nutricional de las cepas de DSE

Uno de los objetivos de este capítulo fue analizar y correlacionar características de las cepas de hongos DSE aisladas, como la tasa de crecimiento, la estrategia nutricional (endofítica o patogénica), el diámetro alcanzado y el estatus endofítico de las plantas de la que las cepas fueron aisladas (E+/E-), de manera de ampliar nuestro conocimiento sobre cómo las plantas pueden atraer microorganismos beneficiosos y restringir patógenos.

Los análisis mostraron una correlación positiva, aunque no significativa entre el estatus de *Epichloë* de la planta de origen y la estrategia nutricional de las cepas

aisladas. No obstante, al analizar los resultados de los aislamientos se observó que de los 18 obtenidos a partir de plantas E+, 11 fueron endofíticos y 7 patogénicos, mientras que de los 11 aislamientos de plantas E-, 3 fueron endofíticos y 8 patogénicos. Esta tendencia también se evidencia en la distribución espacial de las cepas en el análisis multivariado, lo cual destaca la alta proporción de cepas de DSE con rol endofítico asociadas a plantas en simbiosis con endofitos *Epichloë*.

Aunque existe evidencia de que los genes de la planta influyen en la estructura de la comunidad microbiana (Bulgarelli *et al.*, 2012; Haney *et al.*, 2015; Schlaeppi *et al.*, 2014), no está claro si las interacciones planta-microbioma se rigen por principios similares a las simbiosis mutualistas o si responden a reglas diferentes. Al menos tres etapas pueden caracterizar la interacción simbiótica: i) "gating" metabólico, donde las plantas restringen el acceso microbiano mediante metabolitos selectivos; ii) reconocimiento dual de receptores, donde señales microbianas activan programas específicos de simbiosis o inmunidad; y iii) integración de señales ambientales que modulan la simbiosis (Thoms *et al.*, 2021). En la etapa de "gating" metabólico, la variedad de metabolitos en las plantas podría conferir una gran especificidad simbiótica, permitiéndoles seleccionar simbiontes beneficiosos y restringir patógenos (Singh *et al.*, 2023). En nuestro sistema, la asociación con endofitos *Epichloë* podría jugar un papel fundamental en la composición de los exudados radicales, los cuales, como discutiremos más adelante, impactan el establecimiento de otras simbiosis, como las de los HMA (Novas *et al.*, 2011; Vignale *et al.*, 2018; 2020). A nuestro conocimiento no existen otros estudios que hayan explorado el efecto de la asociación con endofitos *Epichloë* sobre estos parámetros en cepas de DSE u otros endofitos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las plantas de *B. auleticus* asociadas con *E. platensis* promueven la asociación con cepas de DSE que desempeñan un rol endofítico.

Entre otros resultados, se observó una correlación significativa positiva entre la tasa de crecimiento y el diámetro de la colonia, por lo que en los siguientes análisis se excluyó la variable diámetro de la colonia para evitar "redundancias". Un resultado destacable es que no se encontró correlación entre la tasa de crecimiento y la estrategia nutricional, por lo que, al menos, para las cepas estudiadas, no se puede adjudicar una mayor tasa de crecimiento a cepas patogénicas. Un pilar fundamental

de las teorías clásicas sobre la evolución de la virulencia es la suposición de que la tasa de crecimiento del patógeno se correlaciona positivamente con la virulencia, argumentando que los patógenos de crecimiento rápido son más virulentos porque consumen recursos del hospedante más rápidamente que los de crecimiento lento (Choisy y de Roode, 2010, Alizon *et al.*, 2013). Sin embargo, un estudio reciente propone una nueva hipótesis: además de la tasa de crecimiento, la eficiencia metabólica también influye en la virulencia, y el resultado final depende de cómo interactúan estas dos propiedades (Lindsay *et al.*, 2021). Los autores sugieren que la relación entre la tasa de crecimiento y la virulencia puede ser tanto positiva como negativa, dependiendo de (a) la interacción entre tasa de crecimiento y eficiencia metabólica, y (b) cómo la tasa de crecimiento afecta otros procesos de la enfermedad, como los costos dependientes del tiempo de superar las defensas del hospedante. Así, la virulencia no sería simplemente proporcional a la tasa de crecimiento del patógeno, como se asumía clásicamente. En este estudio, no evaluamos la relación entre la tasa de crecimiento y la virulencia de las cepas, por lo que no podemos determinar si coincide con esta hipótesis. Las tres cepas de *Microdochium bolleyi* (C23A2, C51, CG2) fueron de las que presentaron las mayores tasas de crecimiento incluidas en este análisis siendo algunas de estas cepas endofíticas (C23A2 y C51) y otra patogénica (CG2), por lo que nos inclinamos a pensar que la tasa de crecimiento es el reflejo de una característica intrínseca de la cepa más que de su estrategia nutricional. Por lo tanto, se necesita una comprensión mecanicista tanto de la relación entre la tasa de crecimiento del patógeno y la virulencia, como de la relación entre la tasa de crecimiento de cada cepa y su estrategia nutricional.

En relación a parámetros de colonización, se observó una correlación negativa y significativa entre el estatus endofítico de las plantas de origen y la colonización a través de HSO. Sin embargo, dada la cantidad limitada de material analizado, y la disparidad entre plantas E+ (6) y E- (2), es prudente ser cauteloso al momento de realizar conclusiones. Además, se encontró una correlación negativa entre HSH y la tasa de crecimiento, lo que indica que una mayor colonización por este tipo de hifas podría estar asociado a una menor tasa de crecimiento fúngico.

En las demás variables, se observaron correlaciones no significativas. En cuanto a la estrategia nutricional, se registró una correlación negativa moderada con las HSH, lo

que sugiere que esta estrategia podría relacionarse con una menor formación de estas estructuras. Asimismo, se detectó una correlación positiva muy débil con los M, lo cual sugiere una relación leve entre la estrategia endofítica y la presencia de estas estructuras de resistencia. Al no detectarse correlación con las HSO ni con la tasa de crecimiento, se infiere que estos factores no están fuertemente influenciados por la estrategia nutricional endofítica.

A partir de estos resultados, no es posible detectar relaciones claras entre la asociación de endófitos *Epichloë* en la planta y el tipo de colonización que desarrollan las cepas de DSE en las raíces. Sin embargo, en un estudio de campo (Terlizzi *et al.*, 2022), se detectó que las plantas E+ presentaban un patrón de colonización más uniforme que las E-. A diferencia del mencionado estudio, donde no se pudo asignar los patrones evaluados a ninguna cepa en particular, en esta aproximación metodológica es posible realizar una descripción más detallada de cada cepa. Dado el limitado material obtenido, especialmente en los casos en los que la cepa inoculada resultó patogénica, proponemos repetir este ensayo utilizando plántulas más grandes, de modo que se tenga mayor oportunidad de recuperar material vegetal suficiente para completar las caracterizaciones aquí iniciadas.

En el análisis de componentes principales (PCA), se observa que las cepas con estrategia nutricional endofítica, como *Herpotrichia* sp. (CG5B), *T. blackeriella* (C71A), *M. bolleyi* (C23A2) y *Periconia macrospinosa* (C87) se agrupan junto con la cepa patogénica *M. bolleyi* (C51). Mientras que, las demás cepas, todas de estrategia patogénica (*M. bolleyi* (CG2), *S. terrestris* (C53) y *Hymenoscyphus* sp. (C54)) se agrupan según el estatus endofítico de las plantas de origen. Por un lado *S. terrestris* (C53) e *Hymenoscyphus* sp. (C54) mostraron una asociación positiva con las HSH, mientras que *M. bolleyi* (CG2) se correlacionó positivamente con las HSO y, en menor grado, con los microesclerocios (M). Este análisis sugiere que la estrategia nutricional y el estatus endofítico de la planta del cual fueron aisladas, influye en la agrupación de las cepas. Estudios previos sobre la colonización de DSE en gramíneas (Vandegrift *et al.*, 2015; Slaughter *et al.*, 2019; Terlizzi *et al.*, 2022), muestran diferentes patrones de colonización dependiendo del estatus endofítico de la planta de la que fueron aisladas.

En este estudio, las cepas asociadas a plantas E- mostraron una alta relación con HSO y con M, mientras que las cepas aisladas de plantas E+ se asociaron más frecuentemente con HSH. Esto contrasta con los resultados anteriores, donde se reportó mayor colonización de microesclerocios en plantas E+ (Terlizzi *et al.*, 2022). La diferencia puede deberse tanto al enfoque del análisis (patrón de colonización frente a correlación entre distintas variables) como al número limitado de cepas analizadas en este estudio, debido a la baja cantidad de raíces obtenidas en el ensayo de resíntesis.

Estos resultados subrayan la complejidad y variabilidad en las interacciones entre múltiples simbiontes, lo que dificulta generalizar los patrones observados. Además, en este análisis se incluyeron 3 cepas de *M. bolleyi*: C23A2 (endofítica aislada de planta E+), C51 (patogénica aislada de planta E-) y CG2 (patogénica aislada de planta E+), que mostraron un comportamiento distinto a pesar de ser aisladas de *B. auleticus* del mismo sitio y bajo las mismas condiciones. Este resultado respalda lo observado en el ensayo de solubilización de P, donde las cepas mostraron diferencias en su capacidad para solubilizarlo, ya que algunas cepas de la misma especie lograron solubilizar P mientras que otras no. Además, estudios previos han reportado resultados similares, indicando variabilidad en las capacidades fisiológicas incluso entre cepas pertenecientes al mismo género (Rothen *et al.*, 2018; Echeverría *et al.*, 2024). Esto sugiere que las capacidades funcionales pueden variar significativamente dentro de una misma especie, posiblemente debido a diferencias genéticas o adaptaciones específicas, por lo que refleja la importancia de caracterizar cada cepa de manera individual para comprender su comportamiento y potencial funcional, subrayando que, aunque comparten un mismo origen, las cepas pueden tener respuestas y capacidades metabólicas diferenciadas.

Efecto de los endofitos *Epichloë* sobre el desarrollo *in vitro* de cepas de DSE

La interacción planta-endofito puede modificar las condiciones de la rizósfera. Tal como se mencionó, los exudados radicales juegan un papel crucial en la composición y actividad de los microorganismos presentes. Por ello, es relevante comprender

cómo los exudados de *Epichloë*, un endofito asociado a *B. auleticus*, podrían afectar a otros microorganismos como los DSE que se asocian al mismo hospedante. Estudios previos han demostrado diferencias en la composición química de los exudados de plantas E+ y E-, lo cual afecta la diversidad de hongos asociados a la rizósfera (Guo *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* y a campo evaluaron diferentes concentraciones de exudados de *Epichloë* en HMA y observaron una promoción en los estados pre-infectivos y en la colonización, no sólo de las plantas asociadas a *Epichloë* (Novas *et al.*, 2011; Vignale *et al.*, 2018) sino también en plantas circundantes (Vignale *et al.*, 2020). Sin embargo poco se conoce sobre el efecto de los mismos sobre los DSE (Terlizzi *et al.*, 2022) y más aún sobre diferentes estrategias nutricionales de las cepas fúngicas.

En el ensayo preliminar, al comparar dos cepas, una endofítica (*Microdochium bolleyi*, C23A2) y otra patogénica (*Setophoma terrestris*, C53), expuestas a distintas concentraciones de exudados de *Epichloë* los resultados indicaron que *M. bolleyi* mostró un crecimiento más homogéneo en todas las concentraciones de exudados en comparación con *S. terrestris*. Para *M. bolleyi*, no se detectaron diferencias significativas en su crecimiento ante las distintas concentraciones de exudados (Terlizzi *et al.*, 2022). Sin embargo, *S. terrestris* experimentó una disminución en su crecimiento a medida que aumentaba la concentración de exudados de *Epichloë*. Estos resultados sugieren un efecto inhibidor de *Epichloë* sobre la cepa patogénica. Para comprender este efecto se decidió realizar un ensayo con 5 cepas, 3 de ellas endofíticas (*M. bolleyi*, C23A2; *T. blackeriella*, C71A; *Herpotrichia* sp., CG5B) y 2 patogénicas (*S. terrestris*, C53; *P. helicoides*, CE8). Los resultados fueron similares al ensayo preliminar, se ha observado una promoción del crecimiento en las cepas endofíticas a distintos tiempos y concentraciones de exudados. En el caso de *M. bolleyi* los mayores valores se observaron para la concentración de 0.5% de exudados en los días 8, 10 y 12. Mientras que para *T. blackeriella* las concentraciones de 0.5% y 6% promovieron el crecimiento de la colonia, aunque se observó una disminución del mismo, al día 14 para el tratamiento de 3% de exudados. *Herpotrichia* sp. presentó mayores diámetros de la colonia para la concentración de 6%. Al analizar las cepas patogénicas, *S. terrestris* presentó resultados similares a los observados en el ensayo preliminar, ya que los menores valores de diámetro se dieron en la máxima concentración de exudados. Mientras que en *P. helicoides* se

detectaron diferencias significativas entre algunas concentraciones para algunos días, por ejemplo se observaron diámetros inferiores al control, para las concentraciones de 3% y 6%, a partir del día 8.

Estos resultados, muestran un hallazgo prometedor ya que *Epichloë* presentaría un efecto promotor del crecimiento en las cepas endofíticas, tal como se observó con los HMA, e inhibidor en las cepas patogénicas dependiendo de las concentraciones. De acuerdo a los antecedentes, este efecto diferencial puede deberse a la composición química de los exudados, la concentración y la identidad de cada cepa.

Los compuestos químicos derivados de plantas desempeñan un papel clave en la atracción y mantenimiento de microorganismos asociados, incluyendo metabolitos especializados que no solo repelen patógenos, sino que también regulan la colonización de endófitos (Singh *et al.*, 2023). Por ejemplo, la colonización equilibrada y la actividad promotora del crecimiento vegetal (PGP) de *Colletotrichum tofieldiae* en *Arabidopsis* dependen de metabolitos de la vía del triptófano, como se demostró en mutantes de plantas. En tabaco, los metabolitos especializados santhopina y nicotina son responsables del enriquecimiento endofítico del género bacteriano *Arthrobacter*, que cataboliza estos compuestos (Shimasaki *et al.*, 2021). Aunque la composición de los exudados de *B. auleticus* y de *Epichloë platensis* es desconocida en este estudio, se sabe que las condiciones del entorno pueden influir en su perfil químico. Por lo tanto, es crucial realizar estudios complementarios para comprender con mayor profundidad estos mecanismos y confirmar el impacto de *Epichloë* en distintos microorganismos.

Impacto de *Setophoma terrestris* en el desarrollo de plantas adultas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë platensis*

La virulencia, definida como el daño que una cepa patógena causa al hospedante, se considera una fuerza impulsora en la coevolución entre hospedante y patógeno (Read, 1994; Frank, 1996). El éxito de un patógeno depende de la susceptibilidad del hospedante, la capacidad de reproducción del patógeno y las condiciones ambientales, incluyendo factores como temperatura, intensidad de luz, humedad y período de rocío (Levy y Cohen, 1983a,b). Además, los efectos del patógeno pueden

variar según la etapa de crecimiento de la planta, ya que las plantas adultas suelen sufrir menos daños que las semillas o plántulas, lo cual es especialmente relevante en especies herbáceas de corta vida (Blaney & Kotanen, 2001; Gilbert, 2002).

Todas las cepas aisladas en este estudio provienen de tejido asintomático, sin embargo, varias de ellas resultaron patogénicas en el ensayo de resíntesis. Estos resultados nos llevaron a preguntarnos qué factores podrían generar estas diferencias y decidimos comenzar evaluando la edad de la planta.

Para este análisis seleccionamos la cepa identificada molecularmente como *Setophoma terrestris* (C53), clasificada como patogénica según el ensayo de resíntesis (Capítulo 1), donde se observó la presencia de síntomas de podredumbre basal. Se inocularon plantas de 4 meses y a los 6 meses, durante la cosecha, se observó una coloración rosada en las raíces. Este síntoma, tal como se mencionó en el Capítulo 1, es característico de la enfermedad causada por esta especie en hospedantes como cebolla y tomate y también se la reportó en canola (*Brassica napus*) en Canadá (Yang *et al.*, 2017), calabacita (*Cucurbita maxima*) en EE. UU. (Rivedal *et al.*, 2018), y en plantas de ajo (*Allium sativum*) y de té (*Camellia sinensis*) en China (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Además, López-López *et al.*, (2024) observaron en follaje de plantas de *Solanum lycopersicum* clorosis generalizada, con crecimiento raquíctico y senescencia de las hojas, mientras que en las raíces, se desarrollaron lesiones de color café oscuro y rosado, además de textura corchosa. Sin embargo, aparte de la coloración, en este estudio no se detectaron otros síntomas de enfermedad en las plantas adultas. Además, los pesos secos de vástago y raíz, así como la longitud de las hojas no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el tratamiento E-S- el que presentó los valores más bajos. Asimismo, se detectó un incremento significativo en el peso seco de vástago para el tratamiento E-S+, este resultado coincide parcialmente con lo observado por Poveda *et al.*, (2022), mencionado en el Capítulo 1, quienes registraron por primera vez, un aumento del peso fresco de vástago de plantas de *Brassica nigra* y *B. carinata*. Sin embargo, es necesario mencionar que *S. terrestris* es un patógeno de crecimiento lento, y en ciertos casos, se han observado síntomas a las 12 semanas de inoculación (Rivedal *et al.*, 2018) lo que demuestra que quizás los tiempos del ensayo deben ser mayores para observar síntomas más pronunciados en plantas adultas. Por otro lado, los múltiples repiques para mantener activa la cepa, pueden reducir el

grado de virulencia, reduciendo o atrasando la aparición de los síntomas (de Gruyer y Borema, 2002).

Lo observado en este ensayo sugiere que el comportamiento de la cepa puede depender del estado fenológico de la planta, ya que las plantas adultas, al estar mejor establecidas, podrían ser más resistentes a enfermedades. En ese sentido O'brien *et al.*, (2021) destacan cómo las interacciones planta-microorganismo influyen en la fenología vegetal, afectando eventos clave como germinación, floración y senescencia. Los microorganismos pueden modificar la adquisición de nutrientes, alterar la señalización hormonal y mediar las respuestas al estrés, impactando significativamente el desarrollo y la aptitud de las plantas, a su vez destacan el papel de estos en la regulación del crecimiento vegetal y en la adaptación a condiciones ambientales. Hasta el momento, no existen estudios con cepas DSE que evalúen parámetros de crecimiento en distintas etapas fenológicas, aunque investigaciones previas han mostrado resultados variados según la edad de la planta, como mayor diversidad de hongos DSE en raíces de plantas jóvenes de soja, además de una composición diferencial entre etapa vegetativa y etapa reproductiva (Rothen *et al.*, 2017) y colonización de HMA más pronunciada en plantas adultas de *B. auleticus* asociadas a *Epichloë* (Vignale *et al.*, 2016). También pueden mencionarse ensayos preliminares en trigo y cebada en los que las plantas inoculadas con un DSE identificado como *Dreschlera* sp. con o sin un HMA, mostraron diferencias según la etapa de crecimiento, como adelantos en la espigazón en presencia del DSE en trigo o mayor biomasa en cebada en presencia de DSE+HMA, 75 días después de la siembra (Lo, 2013). La colonización asintomática de endofitos se interpreta como un equilibrio dinámico que Schulz y Boyle (2005) denominan equilibrio de antagonismos, este puede interpretarse como una estrategia de supervivencia. Durante la interacción siempre hay, al menos un grado de virulencia por parte del hongo, aunque sólo sea para permitir la colonización y el acceso a nutrientes y refugio. Este desbalance podría estar relacionado con una alteración en el equilibrio entre el microorganismo y el hospedante (Kuo *et al.*, 2014). Las interacciones dependen de factores abióticos, como los parámetros físicos del suelo y las condiciones climáticas, las que podrían desempeñar un papel central en la modulación del resultado neto en las interacciones múltiples (Lugo *et al.*, 2018; Slaughter *et al.*, 2018). Por lo que es difícil establecer

comparaciones directas entre los resultados obtenidos en maceta y en el ensayo *in vitro* de resíntesis.

En relación al éxito de la infección por *S. terrestris* esta fue confirmada mediante su re-aislamiento a partir de raíces. A partir de la cuantificación del nivel de colonización, se detectó que las hifas septadas hialinas HSH fueron las estructuras más abundantes (76.23%), seguidas por las HSO (12.66%) y luego por los M (11.11%). La colonización DSE, específicamente HSH y HSO, en plantas asociadas con *Epichloë* ha sido estudiada previamente, sin observar un efecto claro de promoción de la colonización relacionado con la presencia o ausencia de *Epichloë* (Vandegrift *et al.*, 2015; Slaughter *et al.*, 2019). Sin embargo, sí se ha detectado una mayor colonización de microesclerocios en plantas E+ (Terlizzi *et al.*, 2022). No obstante, en este ensayo se observaron diferencias en la colonización según la estructura fúngica y la presencia de *Epichloë*. No se detectaron diferencias en las HSH ni en los microesclerocios atribuibles a la asociación con *Epichloë*. Por otro lado, las HSO fueron significativamente más abundantes en plantas E+ (82.05% vs 19.9%). Las HSH son difíciles de teñir con Trypan Blue, posiblemente por la ausencia de quitina, en su lugar se pueden visualizar con Sudán IV, que tiñe los lípidos. Barrow y Aaltonen (2001) observaron estas hifas intra e intercelularmente en *Atriplex canescens*, asociándolas con una fase activa de intercambio de nutrientes entre el hospedante y hongos DSE, mientras que Yu *et al.*, (2001) sugieren que representan una etapa pre-melanización. Respecto a los microesclerocios, estos se caracterizan por sus paredes gruesas y un citoplasma rico en glucógeno, proteínas y polifosfato, estas estructuras pueden mejorar la absorción y el almacenamiento de nutrientes en las plantas, lo que puede aumentar la aptitud del hospedante en condiciones adversas y permanecer en estado de latencia durante condiciones desfavorables (Jumpponen 2001; Yu *et al.*, (2001). En nuestro caso, dado los resultados obtenidos, esto podría explicar la ausencia de síntomas y el aumento en el peso seco de vástago en el tratamiento E-S+, demostrando un equilibrio de antagonismos, mencionado previamente, entre *B. auleticus* y *S. terrestris*. Asimismo, el análisis de correlación mostró una relación positiva entre la estrategia nutricional y el estatus endófitico de las plantas de origen, si tenemos en cuenta lo mencionado y dado que las cepas utilizadas fueron aisladas de plantas E+, la reinoculación en plantas adultas E+ sugeriría que la presencia de *Epichloë* podría estar modulando el equilibrio entre la planta hospedante y *S.*

terrestris. Estos resultados destacan la importancia de continuar investigando el papel de los endofitos en las interacciones múltiples que permitan una optimización del rendimiento y salud de las plantas asociadas.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Se identificaron cepas de endofitos septados oscuros asociadas a *B. auleticus* con capacidad de solubilizar fósforo, independientemente del estatus de *Epichloë*.
- La asociación con endofitos *Epichloë* influye en la selección por parte del hospedante de las estrategias nutricionales de las cepas fúngicas con las que se asocia.
- *Setophoma terrestris* mostró patogenicidad dependiente del estado fenológico del hospedante, con mayor efecto en plántulas jóvenes.
- *Epichloë* promovió la colonización de *Setophoma terrestris* a través de hifas septadas oscuras, sin evidenciar efectos negativos en la biomasa de las plantas hospedantes.
- Los exudados de *Epichloë* muestran efectos diferenciados sobre las cepas de hongos septados oscuros (DSE): actúan como promotores o neutros para las cepas endofíticas y como inhibidores para las cepas patogénicas.

3

5

Inoculación de *Thelonectria blackeriella* en plantas de *B. auleticus* asociadas o no al endofito *Epichloë*. Ensayo en invernáculo

Capítulo

INTRODUCCIÓN

Está ampliamente documentado que los hongos DSE resultan tener un alto potencial como inoculantes. En efecto, existen muchas evidencias de que estos endofitos otorgan beneficios, sobre todo sobre el crecimiento y la adquisición de nutrientes y manejo del agua y mejorando la respuesta ante condiciones adversas del ambiente (Jumpponen y Trappe, 1998; Newsham, 2011; Knapp *et al.*, 2012). En cuanto a la nutrición y manejo del agua, se ha demostrado que influyen en la asimilación de fósforo (P) y nitrógeno (N) (Jumpponen y Trappe, 1998; Jumpponen, 2001; Barrow y Osuna, 2002; Uzuki y Narisawa, 2007; Newsham, 2011). El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que desempeña un papel crucial en procesos como la fotosíntesis, la síntesis de ácidos nucleicos, la formación de azúcares y la producción de energía (Kanse *et al.*, 2015). Sin embargo, en el suelo, el fósforo suele encontrarse en formas insolubles, lo que limita su disponibilidad para las plantas. En este contexto, los MSF desempeñan un papel fundamental al transformar el fósforo insoluble en formas solubles que las plantas pueden absorber con mayor facilidad, especialmente los HSF. La acción de los HSF es relevante en suelos pobres con fósforo disponible, ya que no sólo mejoran la nutrición de las plantas sino que también promueven su crecimiento al mejorar la eficiencia en la disponibilidad de otros oligoelementos y la síntesis de sustancias clave para el desarrollo vegetal (Kanse *et al.*, 2015).

Muchos trabajos determinaron incrementos en los contenidos de P y de N, cuando las plantas estaban inoculadas con estos endofitos. Tal es el caso de aislamientos de DSE en especies de *Carex* provenientes de los Alpes europeos, que al ser re-inoculados demostraron su capacidad para promover el crecimiento vegetal y el contenido de fósforo en los brotes, lo que indica una mejora en la nutrición fosforada de las plantas gracias a la asociación con los DSE (Haselwandter y Read, 1982). Similares resultados fueron obtenidos por Newsham (1999) en plantas de *Vulpia ciliata* inoculadas con *Phialocephala graminicola*. Se considera que el papel significativo de los hongos DSE en la nutrición mineral y absorción de agua está ligado fundamentalmente al aumento de la superficie de contacto con el suelo a través de la red extrarradical de hifas, lo que les permitiría alcanzar microporos no accesibles para las raíces de las plantas Liu y Wei, (2019). Sin embargo, existen muchas evidencias que sugieren que la función de los DSE va más allá de

simplemente mejorar la absorción de nutrientes solubles del suelo, desempeñando un papel crucial en la utilización y facilitación de fuentes orgánicas presentes en el suelo sustentado en su capacidad saprofítica. Pueden mencionarse el trabajo de Upson *et al.*, (2009) quienes evaluaron cepas de DSE pertenecientes al orden *Helotiales* y sugirieron que los DSE fueron capaces de mineralizar péptidos y aminoácidos en la rizósfera, haciendo que el nitrógeno esté más disponible para las raíces, lo que se tradujo en una inducción del crecimiento y aumentos en los contenidos de nitrógeno. La ya mencionada revisión realizada por Newsham (2011) incluyó datos obtenidos a partir de ensayos publicados en los que las plantas habían sido inoculadas con DSE en sustratos estériles. Los análisis sugieren que los DSE mejoran el rendimiento de las plantas en condiciones controladas, en particular cuando todo o la mayoría del N está disponible en forma orgánica. En un trabajo más reciente, tres aislamientos *P. fortinii* obtenidos a partir de raíces de *Asparagus officinalis*, aumentaron el crecimiento al utilizar fuentes orgánicas de fósforo y nitrógeno (Surono y Narisawa, 2017). Por su parte, Vergara *et al.*, (2017) al inocular cepas de DSE junto a fuentes orgánicas e inorgánicas obtuvieron resultados similares en tomate, con excepción de una de las cepas que mostró mayor contenido de K y área foliar en presencia de la fuente inorgánica. Trabajando con la misma cepa en plantas de arroz, Vergara *et al.*, (2019) comprobaron que la misma cepa indujo la expresión y actividad de bombas de H⁺ como estrategia para la recuperación de N a partir de la fuente inorgánica. Todos estos trabajos dan cuenta de la importancia de los hongos DSE como descomponedores de materia orgánica, lo que les permitiría actuar como facilitadores en la movilización de compuestos de P y N. En este sentido, este aspecto complementaría las funciones de los hongos micorrílicos. Della Monica *et al.*, (2015) quienes estudiaron la capacidad de *Phialocephala turiciensis*, *Acephala applanata*, *P. glacialis* y *Phaeomollisia piceae* para solubilizar fosfato inorgánico (P) y mineralizar distintas formas orgánicas, establecieron que mientras los DSE aumentan la reserva de P en la rizósfera, los HMA, los transfieren a la planta. Resultados similares fueron observados por Bi *et al.* (2024). Los análisis realizados por Newsham (2011) sobre la respuesta de las plantas a la interacción con los DSE, revelaron que la concentración de P en los brotes aumentó en las plantas inoculadas con hongos DSE a las que se les aplicaron nutrientes inorgánicos. Esto sugiere que los DSE mejoran la asimilación

de P cuando se combinan con N en soluciones nutritivas o medios de cultivo, destacando su capacidad para potenciar la absorción de nutrientes esenciales cuando se utilizan conjuntamente con fertilizantes inorgánicos.

En América del Sur, el meta-análisis realizado por Cardozo *et al.*, (2023) reveló que pastizales forrajeros nativos de la cuenca del Río de la Plata, que se extiende por Argentina, Brasil y Uruguay, presentan una baja concentración de P. Los autores concluyen que la fertilización con P tiene un impacto limitado en la productividad y que otros factores, como la disponibilidad de N, pueden estar limitando el crecimiento de las plantas.

Como ya fue mencionado en los capítulos 1 y 2, el P es uno de los macronutrientes indispensables, junto con el N, de los 17 elementos esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Constituye uno de los principales factores limitantes para la producción de cultivos en muchos suelos tropicales y subtropicales. Representa el 0,2% del peso seco de las plantas y su carencia restringe su crecimiento y la productividad agrícola (Alori *et al.*, 2017). Además, el P contribuye significativamente en procesos clave como la fotosíntesis, la producción de ATP, la síntesis de ácidos nucleicos, la fijación de N₂ en leguminosas y la resistencia a enfermedades de las plantas (Kanse *et al.*, 2015). La nutrición mineral de las plantas está determinada principalmente por el contenido de P del suelo, que puede ser absorbido como fosfato soluble (Wang *et al.*, 2018). Tal como se ha mencionado en el Capítulo 2, una mayor parte del P del suelo está presente en formas insolubles unidas al aluminio (Al³⁺) o al hierro (Fe³⁺) en suelos ácidos, o al calcio (Ca²⁺) en suelos alcalinos, que no pueden ser utilizadas por las plantas (Wang *et al.*, 2018). En suelos pobres en nutrientes, se requiere la aplicación de fosfato natural de roca (RP) o fertilizantes sintéticos de P para optimizar la producción de cultivos (Alori *et al.*, 2017). Sin embargo, su uso puede tener efectos indeseables como, la pérdida de fertilidad, la reducción de la densidad microbiana y la reducción del rendimiento de los cultivos (Kanse *et al.*, 2015; Alori *et al.*, 2017), además de significativos impactos negativos sobre la comunidad asociada al agroecosistema, los cuerpos de agua y la salud humana. (Vantarakis, 2021). Los microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) llevan a cabo los procesos de acidificación, quelación, reacción de intercambio y síntesis de ácido glucónico (Priyadharsini y Muthukumar 2017).

Por lo tanto, una estrategia alternativa para reducir el uso de fertilizantes sintéticos es utilizar microorganismos residentes (incluyendo bacterias, hongos y actinobacterias) que son capaces de solubilizar nutrientes insolubles en el suelo y son más respetuosos con el medio ambiente y competitivos que los microbios no endofíticos (Spagnoletti *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

En lo que respecta a estudios sobre interacción entre endofitos *Epichloë-Bromus auleticus*-HSF, a nuestro conocimiento hay dos. Por un lado el trabajo de Arrieta *et al.*, (2015), ya mencionado, quienes evaluaron el efecto del endofito sobre la abundancia y diversidad de los HSF en la rizosfera, revelando resultados destacables. Los autores sugirieron que la presencia de *E. pampeana* influye en la diversidad de los HSF, siendo ésta mayor en los suelos con plantas E+ en comparación con aquellos con plantas E-. Esto indica que la asociación con *Epichloë* podría afectar la composición microbiana de la rizósfera, promoviendo una mayor diversidad de microorganismos que solubilizan P. Asimismo, Stefanoni Rubio (2019) ha evaluado el efecto de esta interacción sobre el crecimiento de las plantas. Los resultados indicaron que no se observó una tendencia clara en la incorporación de P entre las plantas E+ y E-, ni una relación consistente entre la concentración de P en el vástago y la biomasa total. Esto indica que la variabilidad en la acumulación de P no se traduce directamente en un aumento en la biomasa, sugiriendo que otros factores pueden estar influyendo en la respuesta de las plantas en cuanto a su crecimiento y nutrición.

Aunque, ya se han mencionado, existen algunos trabajos que han reportado la capacidad de los hongos DSE como solubilizadores. En particular, en nuestro país se han descripto cepas de *Ophiophaerella* sp., *O. herpotricha*, *Cochliobolus* sp., *Setosphaeria rostrata*, *Drechslera* sp. y *Drechslera* sp., aisladas de diversos cultivos (Spagnoletti *et al.*, 2017) y cepas de *Microdochium* sp. y *Exophiala equina*, aisladas de cebada (Echeverría *et al.*, 2024), capaces de solubilizar fosfatos a partir de las fuentes inorgánicas empleadas en este trabajo FTC, FA y FF. Sin embargo ninguno de estos trabajos realizaron evaluaciones que en plantas. En este sentido, se puede mencionar un ensayo preliminar realizado por Barresi *et al.*, (2022), quienes evaluaron algunas de las cepas seleccionadas por Spagnoletti *et al.*, (2017) en plantas de sorgo, en los que si bien detectaron aumentos en algunos parámetros

de crecimiento, no detectaron aumentos en el contenido de P de las plantas y lamentablemente no encontraron estructuras fúngicas en las raíces. Para establecer el verdadero potencial de un microorganismo como inoculante en general, y de un hongo en particular, es necesario realizar ensayos en plantas.

En este Capítulo se evaluó la capacidad de solubilización de P de la cepa seleccionada en el Capítulo 2, en plantas de *B. auleticus* E+ y E-, así como su efecto sobre las mismas.

HIPÓTESIS PARCIALES

- La asociación *Epichloë*-DSE favorece el desarrollo de *B. auleticus*.
- La asociación *Epichloë-Bromus auleticus* favorece el establecimiento de la cepas DSE.
- La inoculación del hongo DSE en plantas de *B. auleticus* facilita la solubilización de nutrientes como el fósforo y la absorción por parte de estas, particularmente en presencia de *Epichloë*.

OBJETIVOS PARCIALES

- Evaluar el efecto conjunto de los endófitos *Epichloë* y de DSE sobre el desarrollo del hospedante.
- Cuantificar el contenido de fósforo en el tejido aéreo de plantas de *Bromus auleticus* asociadas o no a *Epichloë* e inoculadas o no con el DSE, con incorporación o no de una fuente de P inorgánica.
- Analizar el efecto de la asociación con *Epichloë* sobre el grado de colonización del DSE en las raíces de *Bromus auleticus*.
- Evaluar el impacto de la asociación simultánea de *B. auleticus* con endófitos *Epichloë* y endófitos DSE sobre los parámetros de crecimiento del hospedante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los resultados de los capítulos anteriores permitieron seleccionar una cepa endofítica aislada de raíces de plantas E+, con capacidad para solubilizar fósforo en medio NBRIP sólido y líquido, en comparación con otras cepas. La misma ha sido identificada molecularmente como *Thelonectria blackeriella* (C71A). Debido a las características mencionadas, se decidió utilizarla en el ensayo en maceta.

Diseño experimental

Para evaluar el efecto de *Thelonectria blackeriella* y el estatus endofítico de *Bromus auleticus* con o sin el agregado de fósforo inorgánico (P), se llevó a cabo un ensayo en el invernadero del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. El diseño experimental fue factorial totalmente aleatorizado, con tres factores: Estatus endofítico de *Epichloë* (E+, E-), estatus DSE (DSE+, DSE-) y Fósforo (P+, P-), resultando en 8 tratamientos. Se realizaron 15 réplicas por tratamiento y las macetas se mantuvieron en el invernadero por 6 meses (**Fig. 3.1**). En cada maceta se trasplantó una plántula de *B. auleticus* de 10 días de crecimiento.



Fig 3.1. Esquema de los tratamientos realizados en el ensayo en maceta con *Bromus auleticus* e imagen de las plantas en el invernadero. Diseño experimental con tres factores: Estatus endofítico de *Epichloë* (E+, E-), estatus DSE (DSE+, DSE-) y Fósforo (P+, P-), dando como resultado 8 tratamientos con 15 réplicas cada uno.

Preparación de macetas y mantenimiento

Se utilizó como sustrato una mezcla de suelo: perlita: vermiculita en una proporción de 3:1:1 que se esterilizó mediante tindalización a 80°C y presión constante durante 1 hora por 3 días consecutivos con intervalo de 24 h. El suelo utilizado, fue de origen comercial de la marca Loma Verde, la composición del mismo fue humedad: 15-20%, materia orgánica s/ tal cual.11-12%, cenizas s/ tal cual.60-61%, relación C/N:19, nitrógeno: 0.4%, conductividad eléctrica: 2,6 mS/cm y pH: 6,4. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente y germinadas, tal como se mencionó en el Capítulo 1. Diez días después de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 12 cm de diámetro (800 cm³). A los 30 días las plantas fueron inoculadas con la cepa seleccionada y las macetas fueron rotadas periódicamente

en forma aleatoria una vez por semana y regadas 3 veces por semana. A los 5 meses, por única vez, el riego se supplementó con una solución de fosfato tricálcico, hasta una concentración final de 30 mg Pxkg-1 (Omar *et al.*, 1998; Della Monica *et al.*, 2014).

Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo del hongo DSE, se colocaron 300 ml de perlita con 110 ml de malta líquida, en frascos de vidrio (**Fig. 3.2**), los que fueron autoclavados durante 2 horas. Posteriormente, a partir de cultivos de *T. blackeriella* en activo crecimiento en AEM, se sembraron 4 trozos (1,5 x 1,5 cm) del borde de la colonia por frasco. El material se mantuvo a 24 °C en condiciones de oscuridad. A los 20 días, se colocaron 25 gr de inóculo por maceta, aproximadamente 10% del sustrato total (Berthelot *et al.*, 2018) para la inoculación de las plantas. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), a partir de diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000, de un 1 gr de inóculo lo que permitió establecer a partir de la dilución 1/10 una concentración de 726 UFC/ml.



Fig 3.2. Preparación del inóculo. Frascos con vermiculita y malta líquida sembrados con *Thelonectria blackeriella*. Izquierda sustrato al día de sembrado con la cepa DSE. Derecha, cultivo de 20 días con micelio ya desarrollado.

Parámetros de crecimiento

Al momento de la cosecha se midieron los siguientes parámetros de crecimiento en todos los tratamientos:

- Longitud del vástago: Se midió la longitud de la hoja más larga en cada planta.
- Peso seco del vástago y de la raíz: Para estimar el peso seco, la parte aérea fue separada del sistema radicular. Ambas partes fueron pesadas por separado y el material cosechado fue secado a 80°C durante dos días para determinar el peso seco del vástago y de la raíz (g). A su vez, el sistema radical fue dividido en dos fracciones: una para estimar peso seco y otra para re-aislar la cepa inoculada y teñir con Trypan Blue (Phillips y Hyman, 1970), con el fin de cuantificar la colonización.
- Índice de verdor: Se realizaron mediciones del índice de verdor de las hojas utilizando el medidor Minolta SAP-502, que evalúa cuantitativamente la intensidad del verde de la hoja. El SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development), mide la transmitancia de luz a través de una hoja en dos longitudes de onda específicas (650 nm en la región roja y 940 nm en la región del infrarrojo cercano). A partir de estas mediciones, el dispositivo calcula un valor SPAD que se correlaciona con el contenido de clorofila. Este índice es un indicador del estado nutricional y la salud de las plantas, específicamente en términos de nitrógeno, ya que la clorofila está relacionada con el contenido de nitrógeno en las hojas.

Concentración de fósforo en planta

La medición de P en el tejido aéreo de plantas de *B. auleticus* se realizó mediante un procedimiento que comenzó con el secado de las muestras de vástago en una estufa a 80°C durante 48 horas, seguido de la determinación del peso seco. Luego, las muestras se pulverizaron con un molinillo eléctrico hasta obtener 3 grs por planta. Posteriormente, se colocaron en crisoles de 15 ml y se incineraron en una mufla a 500°C durante 5 horas. Las cenizas resultantes se hidrataron con 1 ml de agua destilada. El P presente en las cenizas se extrajo mediante la adición de 10 ml de HCl (2 M), calentando la mezcla hasta la ebullición, según el método descrito por

Sadzawka *et al.*, (2007). Después de enfriar, el extracto se centrifugó, y el P se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el kit Spectroquant Phosphate Test (Art. N° 1.14842, Merck). Esta metodología se aplicó a 5 plantas por tratamiento, seleccionadas al azar.

Colonización de *Thelonectria blackeriella*

Para estimar el nivel de colonización de la cepa inoculada, parte de la biomasa radicular de cada planta se separó, se lavó con agua de la canilla para remover el suelo adherido y las raíces fueron inmediatamente teñidas con Trypan Blue (Phillips y Hayman 1970) (ver anexo). La colonización fue medida según McGonigle *et al.*, (1990). Esta metodología se aplicó a 8 plantas seleccionadas al azar por tratamiento.

Re-aislamiento de *T. blackeriella*

Para confirmar el éxito de infección de *T. blackeriella*, se tomaron muestras de raíces al momento de la cosecha. Estas muestras se preservaron a 4°C por un máximo de 24 horas. Posteriormente, se sometieron a un proceso de esterilización superficial que consistió en: Inmersión de las raíces en etanol al 70% durante 1 minuto, inmersión en una solución de lavandina al 10% durante 3 minutos, enjuague con agua estéril, enjuague con una solución de antibiótico (cloranfenicol 100 mg/L), inmersión en solución de etanol al 50% durante 1 minuto y finalmente se realizó un enjuague con agua estéril.

Las raíces se cortaron en segmentos de 0,5 cm y se sembraron en placas de Petri de 15cm Ø que contenían 25 gotas de Gel-Gro (**Fig. 3.3**). Cada gota de Gel-Gro fue observada periódicamente bajo una lupa binocular. En caso de observar micelio emergiendo del interior del segmento de raíz, se realizó un repique a una placa de Petri con AEM para obtener el cultivo puro.



Fig 3.3. Placas de Petri de 15 cm ø con gotas de Gel-Gro, para aislamiento de la cepa inoculada a partir de trozos de 0,5 cm de raíces de *B. auleticus*.

Estatus endofítico de *Epichloë*

El estatus endofítico fue evaluado en las plantas antes de ser cosechadas, utilizando la técnica histológica convencional detallada por Clark *et al.*, (1983). Como criterio se estableció que planta es considerada infectada (E+) si se visualizan hifas características intercelulares colonizando el parénquima cortical (ver **Fig 1** en la Introducción General).

Análisis estadísticos

Parámetros de crecimiento y concentración de fósforo en planta

Las diferencias en los parámetros de crecimiento de las plantas se analizaron mediante modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Las variables cuantificadas incluyeron el índice de verdor, pesos frescos y secos de vástago y raíz, longitud de la hoja más larga y concentración de P en vástago. Los factores principales fijos fueron el estatus endofítico foliar de *B. auleticus* (E+, E-), el estatus endofítico de *T. blackeriella* (DSE+, DSE-) y el agregado de fósforo (P+, P-), dando

como resultado ocho tratamientos. Dado que todas las variables son cuantitativas continuas, se utilizaron modelos de ANOVA para su análisis. Para evitar contaminaciones cruzadas, las macetas fueron mantenidas en bandejas, las cuales se incorporaron como una variable aleatoria en los modelos. Los datos se analizaron utilizando modelos que contemplaron tanto la interacción entre los factores fijos como modelos aditivos. Los supuestos de heterocedasticidad y normalidad se evaluaron gráficamente, a través de las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Se seleccionó el modelo que mejor se ajustara según el criterio de información de Akaike (AIC). Las diferencias entre tratamientos se analizaron utilizando el paquete `emmens` en R, que permite obtener medias marginales estimadas (EMMeans) para los factores involucrados en el modelo. Además, se realizó un análisis de letras homogéneas utilizando la función `cld` (comparisons of least-squares means to derive letter displays). Este método asigna letras a las medias de los grupos para indicar cuáles son significativamente diferentes entre sí. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt). Para todas las variables de crecimiento las medidas fueron tomadas a partir de 15 plantas por tratamiento, mientras que la concentración de fósforo fue analizada en 5 plantas por tratamiento.

Colonización de la raíz

Las diferencias en la colonización de raíces por estructuras típicas de DSE se analizaron mediante modelos lineales generalizados (GLM). Las variables cuantificadas fueron hifas septadas hialinas (HSH), hifas septadas oscuras (HSO) y microesclerocios (M). Se utilizaron como factores principales fijos el estatus endofítico foliar de *B. auleticus* con dos niveles (E+, E-) y el agregado de fósforo (P+, P-). Debido a que los datos son de proporción (número de observaciones/total de campos), se analizaron a través de un modelo binomial. Ante la detección de sobredispersión, también se utilizaron modelos con distribución de Poisson y binomial negativa. Se seleccionó el modelo que mejor se ajustara según el criterio de información de Akaike (AIC). Para determinar el efecto significativo en el modelo de los factores fijos, se utilizó la Prueba de Razón de Verosimilitud (LRT, por sus siglas en inglés). Las diferencias entre tratamientos se analizaron utilizando el paquete `emmens` en R, que permite obtener medias marginales estimadas

(EMMeans) para los factores involucrados en el modelo. Además, se realizó un análisis de letras homogéneas utilizando la función `cld` (comparisons of least-squares means to derive letter displays). Todos los análisis fueron realizados con el software R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt).

Correlación de variables

Se construyeron matrices para evaluar la relación entre variables, dependiendo de los datos disponibles. Se construyó una matriz de correlación con una dimensión de 7×7 (correspondiente a 7 variables) para evaluar las relaciones entre las diferentes variables de crecimiento de las plantas y la concentración de P. Se utilizó un subconjunto de datos extraídos del conjunto de datos original ($N_{total} = 39$), que incluyó sólo a aquellos casos en los que se analizó el P. Por otro lado, se construyó una matriz de correlación con una dimensión de 9×9 (correspondiente a 9 variables) para evaluar las relaciones entre las diferentes variables de crecimiento de las plantas y las estructuras formadas por *T. blackeriella*. Se utilizó un subconjunto de datos extraídos del conjunto de datos original ($N_{total} = 27$), que incluyó a aquellos casos donde se hubieran analizado todas las variables seleccionadas.

Para evaluar las relaciones entre todas las variables registradas, se construyó una matriz de correlación. Se utilizó un subconjunto de datos extraídos del conjunto de datos original ($N_{total} = 14$), que incluyeran aquellos casos donde se hubieran analizado todas las variables seleccionadas. Dado que se analizaron diez variables, la matriz de correlación resultante presentó una dimensión de 10×10 .

Para el análisis de correlación, se aplicó el método de correlación de Pearson, el cual mide la fuerza y dirección de la relación lineal entre pares de variables. Los cálculos se realizaron utilizando el paquete `corrgram` en R, que permite visualizar las correlaciones de manera gráfica.

RESULTADOS

Unidades Formadoras de Colonias

A partir de las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 realizadas, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Fig. (3.4)**. Esto permitió calcular las UFC indicadas en materiales y métodos, y así determinar de manera más precisa el inóculo de *T. blackeriella* en cada maceta.

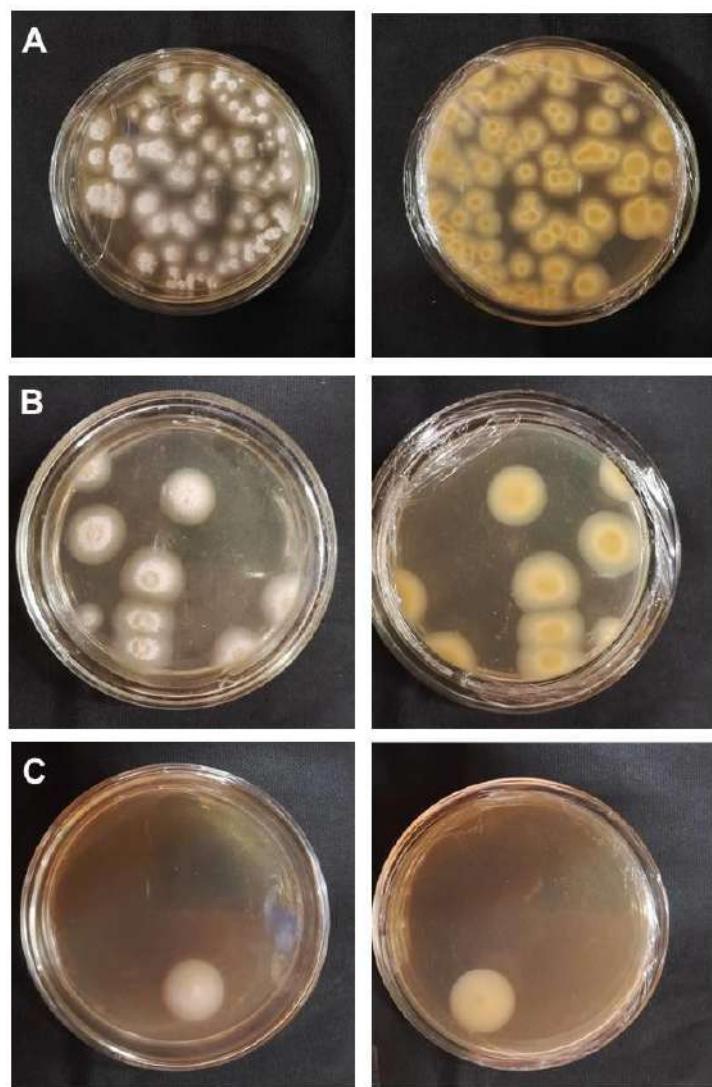


Fig 3.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) correspondiente al inóculo de *T. blackeriella*. Diluciones: **A.** 1/10. **B.** 1/100. **C.** 1/1000. En cada caso se observa a la derecha el anverso y a la izquierda el reverso de cada placa de Petri.

Parámetros de crecimiento de las plantas

Durante los seis meses de ensayo, se realizó un monitoreo continuo del estado general de las plantas. Detectándose un ataque de pulgones que afectó a todos los tratamientos, pero que fue rápidamente controlado.

Largo de vástago

En la **Fig. 3.5** se observan valores similares del largo de vástago para todos los tratamientos, lo que está avalado por el análisis estadístico. No se detectaron tendencias claras. El modelo con el mejor criterio de AIC fue el que consideró la interacción. No se encontraron diferencias significativas debidas a los efectos fijos ($F_E = 0.06$, $p=0.80$; $F_{DSE}=1.98$, $p=0.16$; $F_P=0.02$, $p=0.87$), ni interacción significativa entre ellos ($F_{E/DSE/P} =0.5$, $p=0.48$). Para el análisis y chequeo de supuestos se eliminaron algunos outliers de esta variable.

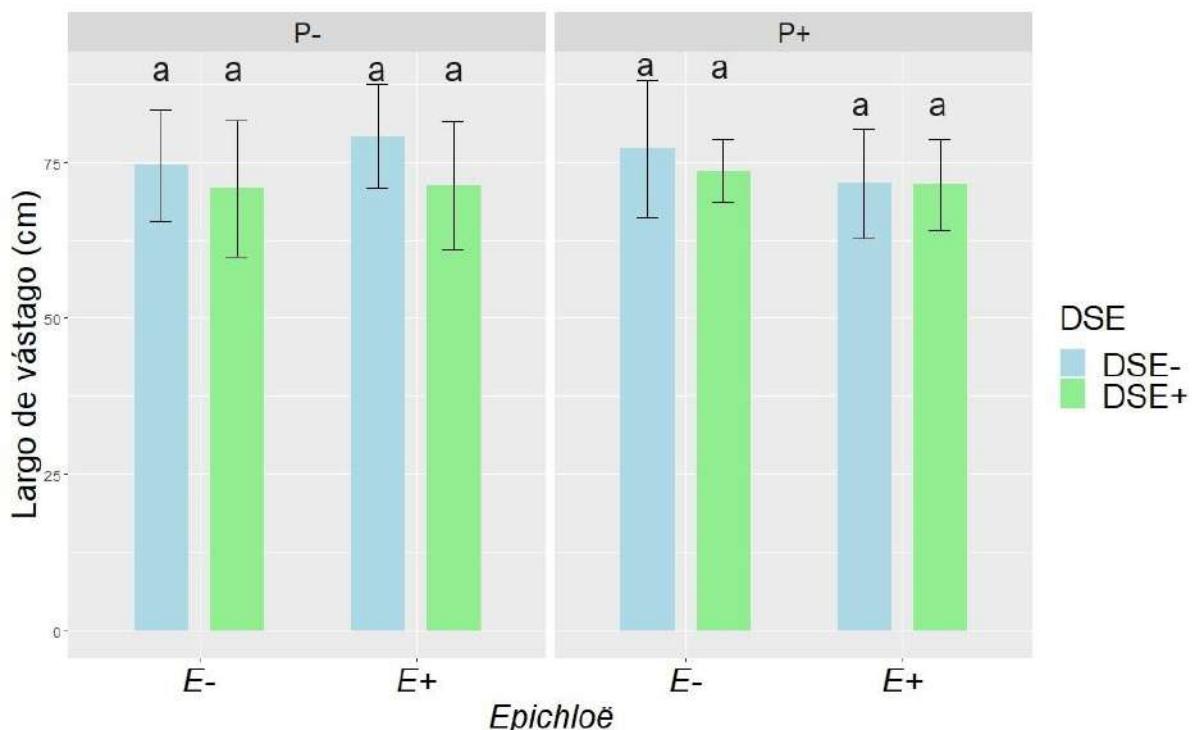


Fig. 3.5. Largo de vástago en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Peso fresco de vástago

A partir del análisis se desprende que el peso fresco de vástago presentó diferencias no significativas debidas a los factores analizados ($X_E = 0.04$, $p=0.85$; $X_{DSE} = 1.44$, $p=0.23$; $X_P = 0.07$, $p=0.79$) y tampoco se detectó interacción significativa entre ellos ($X_{E/DSE/P} = 0.0005$, $p=0.98$). Sin embargo, se observan algunas tendencias en los datos. En general, los mayores valores se obtuvieron en el tratamiento donde se adicionó P. Además, las plantas no asociadas a *Epichloë* (E-) e inoculadas con *T. blackeriella* fueron las que mayores valores absolutos de peso fresco presentaron, independientemente de la adición de P (Fig. 3.6). Cabe aclarar que por falta de cumplimiento del supuesto de heterocedasticidad, esta variable fue modelada a través de Varldent y a través de la transformación logarítmica de los datos. Según el criterio de AIC el modelo que mejor se ajustó fue el de transformación logarítmica con interacción de los factores.

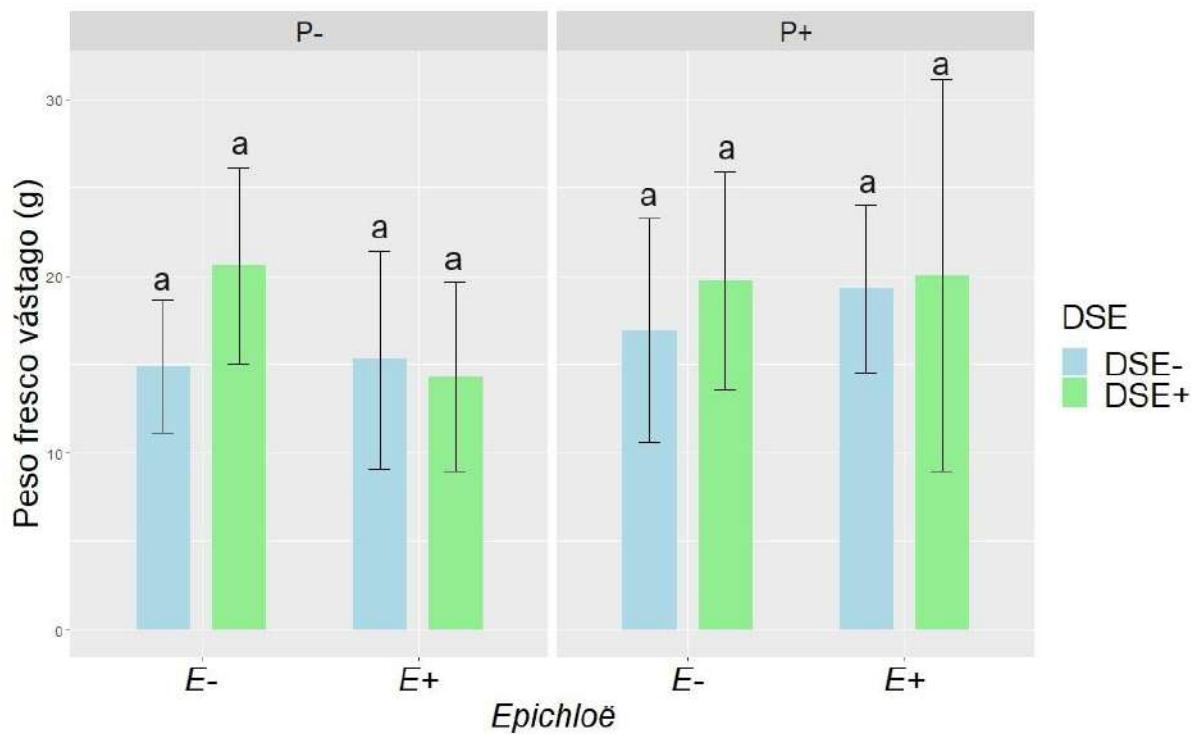


Fig. 3.6. Peso fresco de vástago en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Peso fresco de raíz

Se observa que los mayores valores de peso fresco de raíz se obtuvieron cuando las plantas fueron inoculadas con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (**Fig. 3.7**). Sin embargo, las diferencias observadas no fueron significativas ($X_{\text{P}}=0.05$, $p=0.83$). De manera similar, el tratamiento con mayores valores de peso de raíz fue $\text{P}+/E+$, independientemente del estatus de *T. blackeriella*. Nuevamente, no se observaron diferencias significativas debidas al estatus de *Epichloë* ($X_E=0.64$, $p=0.42$) o al estatus de *T. blackeriella* ($X_{\text{DSE}}=0.0001$, $p=0.99$). Tampoco se detectaron interacciones significativas entre los factores fijos ($X_{\text{E/DSE/P}}=0.81$, $p=0.37$). Al igual que para el peso fresco de vástago, por falta de cumplimiento de los supuestos, esta variable fue modelada a través de Varldent y a través de la transformación logarítmica de los datos. Según el criterio de AIC el modelo que mejor se ajustó fue el de transformación logarítmica con interacción de los factores.

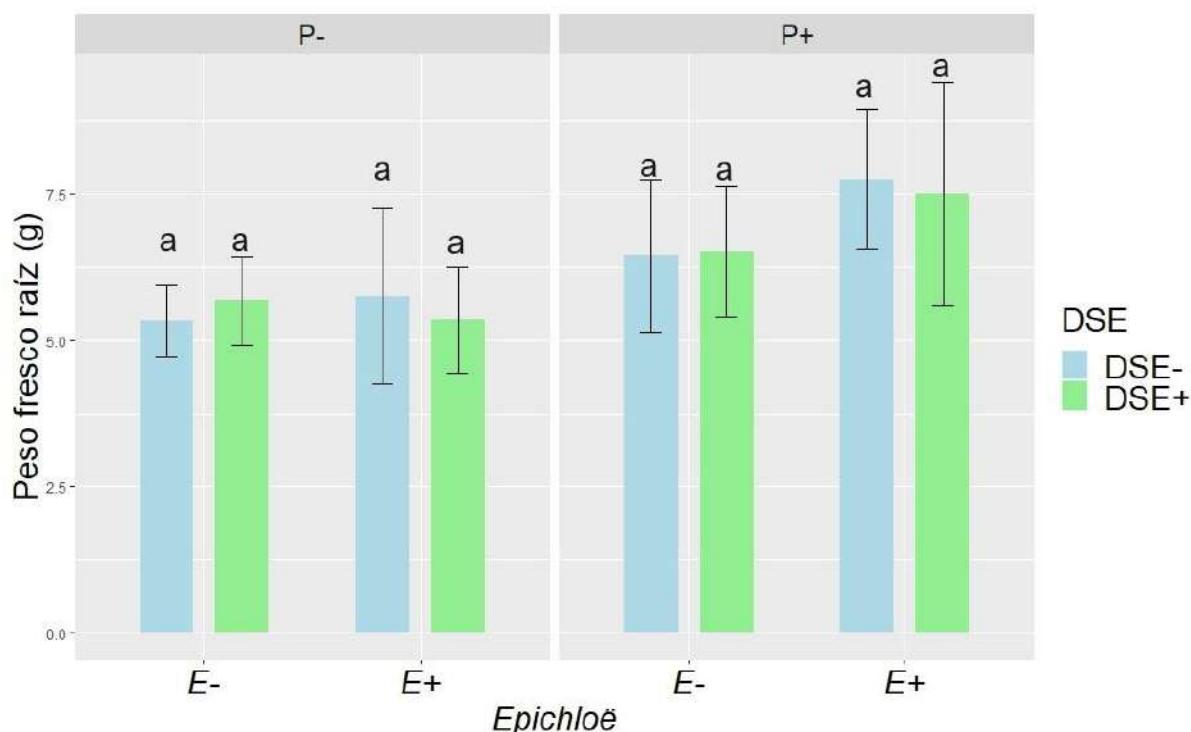


Fig. 3.7. Peso fresco de raíz en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Peso seco de vástago

Esta variable mostró valores similares para todos los tratamientos, lo que se condice con el análisis estadístico. No se observaron diferencias significativas debidas al estatus de *Epichloë* ($F_E = 0.02$, $p=0.87$), al estatus de *T. blackeriella* ($F_{DSE} = 0.77$, $p=0.38$), ni al agregado de P ($F_P=0.045$, $p=0.83$).

Observando minuciosamente las barras, se puede detectar que todos los tratamientos, salvo el P+E+DSE+, muestran mayores valores cuando las plantas fueron inoculadas con *T. blackeriella*. En el tratamiento antes mencionado, el peso del vástago fue menor con la presencia simultánea de los dos endofitos (Fig. 3.8). Cabe aclarar que el modelo con mejor criterio de AIC resultó el que contempla la interacción.

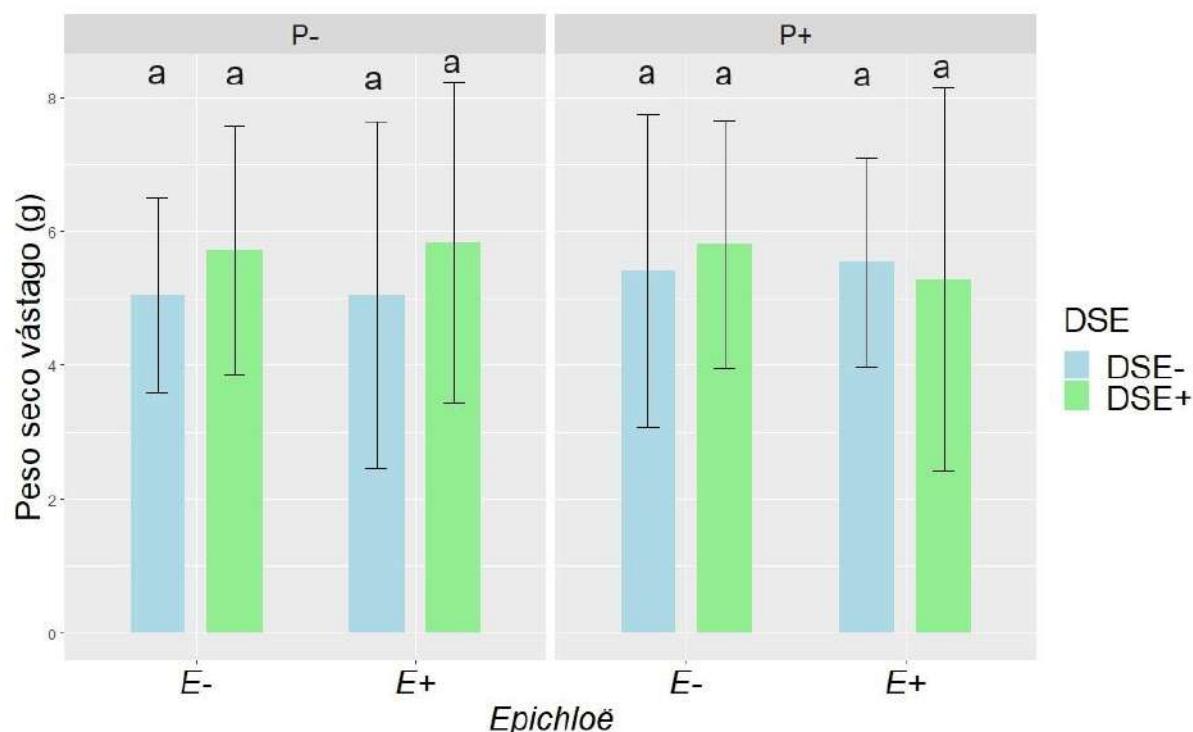


Fig. 3.8. Peso seco de vástago en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Peso seco de raíz

Los mayores valores de esta variable se observan en el tratamiento donde se adicionó $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ al suelo, alcanzando su máximo en el tratamiento P+E+DSE-. De manera similar al peso seco de vástago, no se detectaron diferencias significativas debidas a los efectos fijos ($F_E = 0.37, p=0.54$; $F_{\text{DSE}}=0.29, p=0.59$; $F_P=1.67, p=0.19$).

Algo llamativo de esta variable es la gran dispersión de datos observada en todos los tratamientos (Fig. 3.9). Para el análisis y chequeo de supuestos, al igual que en largo de vástago, se eliminaron algunos outliers de esta variable. El modelo que presentó el mejor criterio de AIC fue el aditivo.

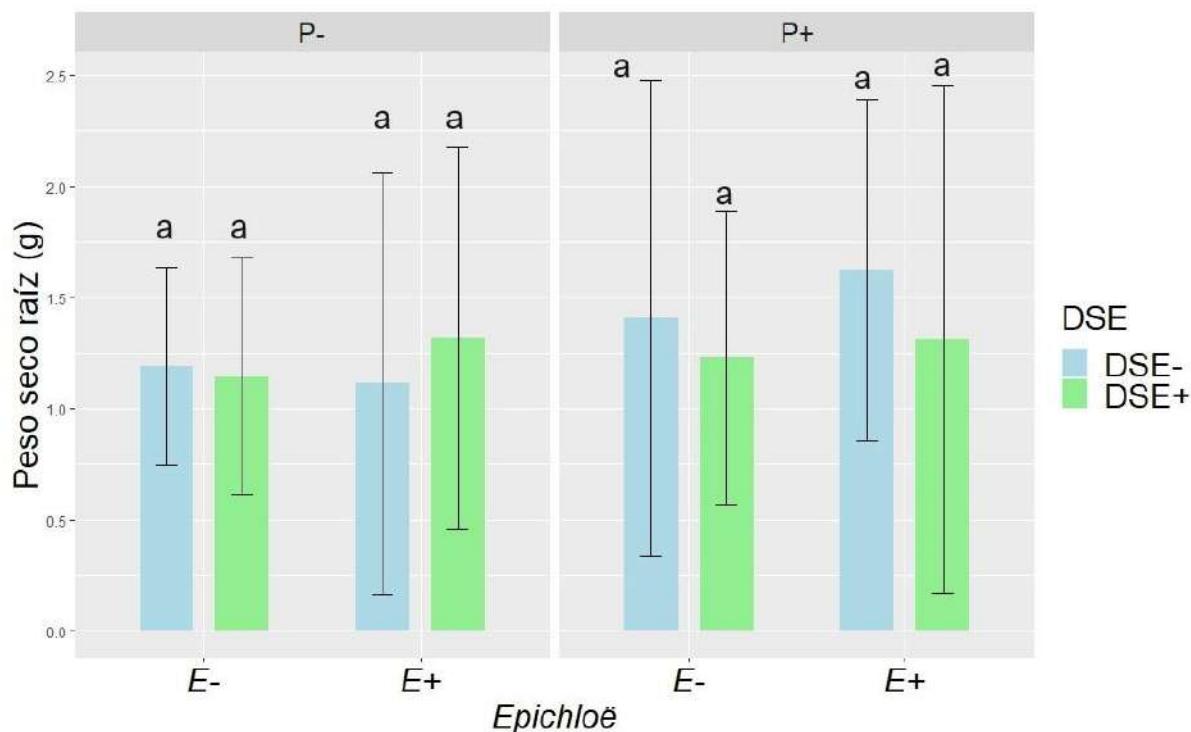


Fig.3.9. Peso seco de raíz en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-) , cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo en formato de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Índice de veredor

Esta variable mostró valores similares para todos los tratamientos (Fig. 3.10), lo que concuerda con la falta de diferencias significativas atribuibles a los efectos fijos o a la interacción entre ellos. En relación a los parámetros obtenidos para cada factor, se obtuvieron los siguientes resultados: respecto al estatus de *Epichloë* ($F_E = 2.09$, $p=0.22$), al estatus de *T. blackeriella* ($F_{DSE} < 0.0001$, $p=0.99$), y al agregado de P ($F_P=1.26$, $p=0.32$). El modelo que presentó el mejor criterio de AIC resultó ser el aditivo.

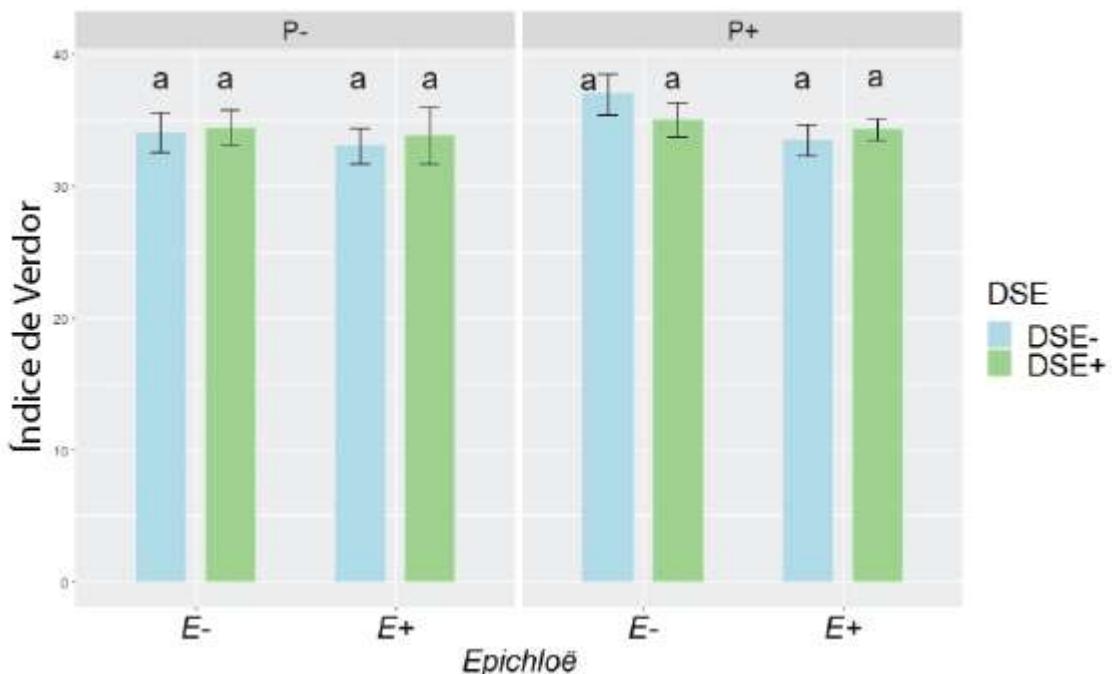


Fig.3.10. Índice de veredor en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=15. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

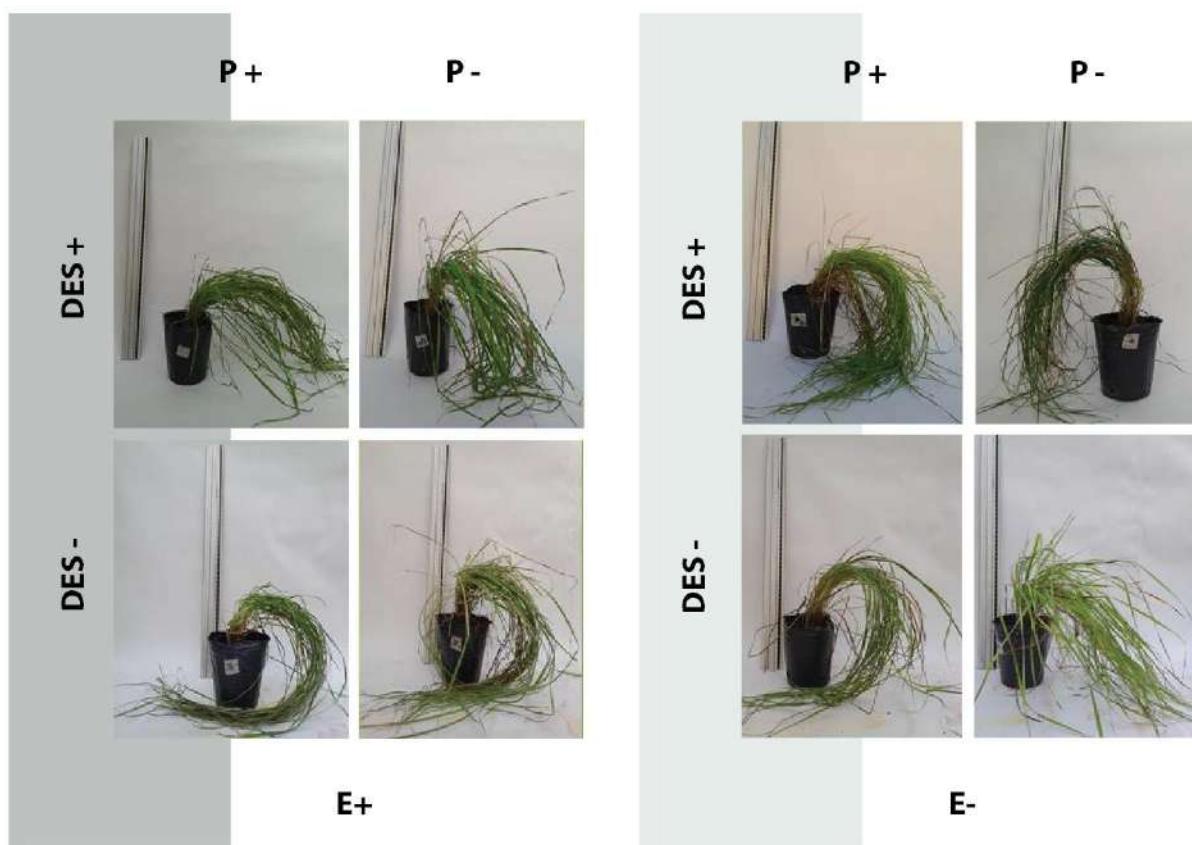


Fig 3.11. Plantas de *Bromus auleticus* al momento de la cosecha. Ocho tratamientos en total. Plantas asociadas o no a *Epichloë* (E+; E-), inoculadas o no con *T. blackeriella* (DSE+; DSE-) con el agregado o no de una fuente de fósforo (P+; P-)

Fósforo en planta

Al observar la **Fig. 3.12.**, se puede apreciar que todos los tratamientos muestran una mayor concentración de P en las plantas cuando no fueron inoculadas con *T. blackeriella*, excepto en el tratamiento P+E+DSE-. No se detectó ningún efecto significativo atribuible al estatus de *Epichloë* ($F_E = 1.17$, $p=0.34$), al estatus de *T. blackeriella* ($F_{DSE} = 1.37$, $p=0.3$), ni al agregado de P ($F_P=0.36$, $p=0.58$).

El modelo con el mejor criterio de AIC resultó ser el aditivo.

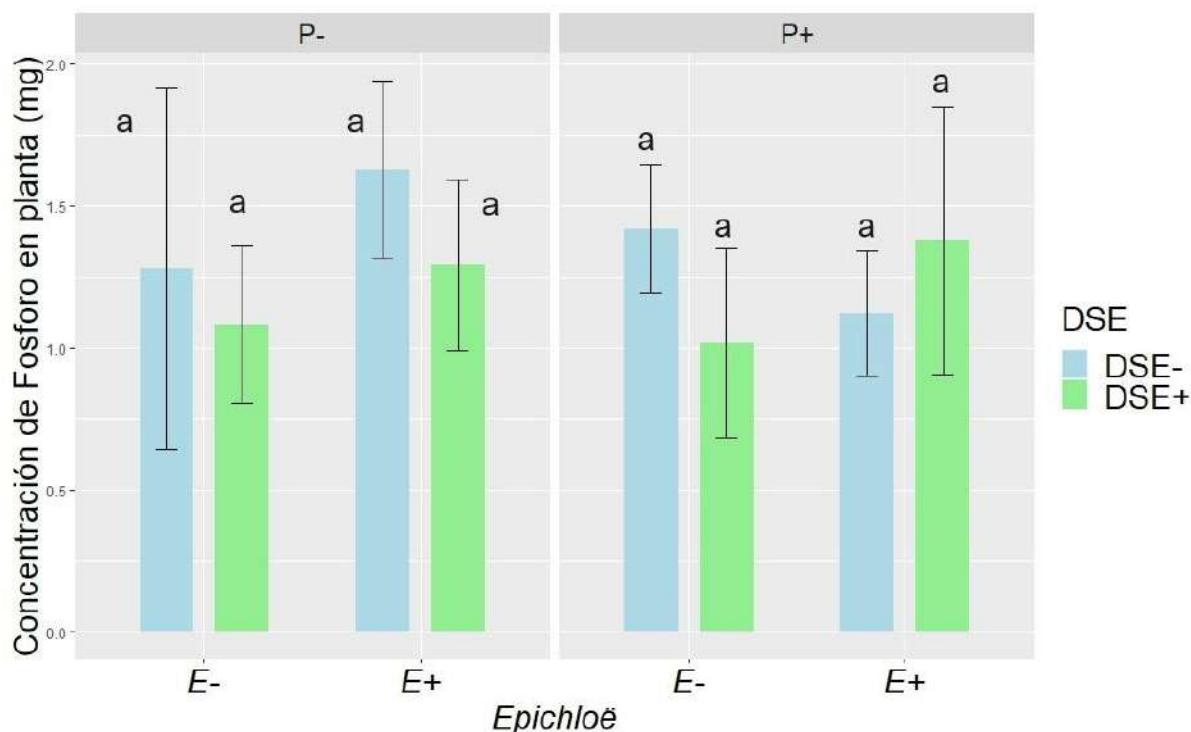


Fig. 3.12. Concentración de fósforo en el vástago de plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), inoculadas (DSE+) o no con *T. blackeriella* (DSE-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. N=5. Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Colonización de las raíces

Las estructuras de los DSE analizadas (**Fig. 3.13**) se observaron en plantas de todos los tratamientos, específicamente en aquellas inoculadas con *T. blackeriella* (DSE+), aunque con diferente frecuencia y comportamiento según cada tratamiento (E+/E-; P+/P-).

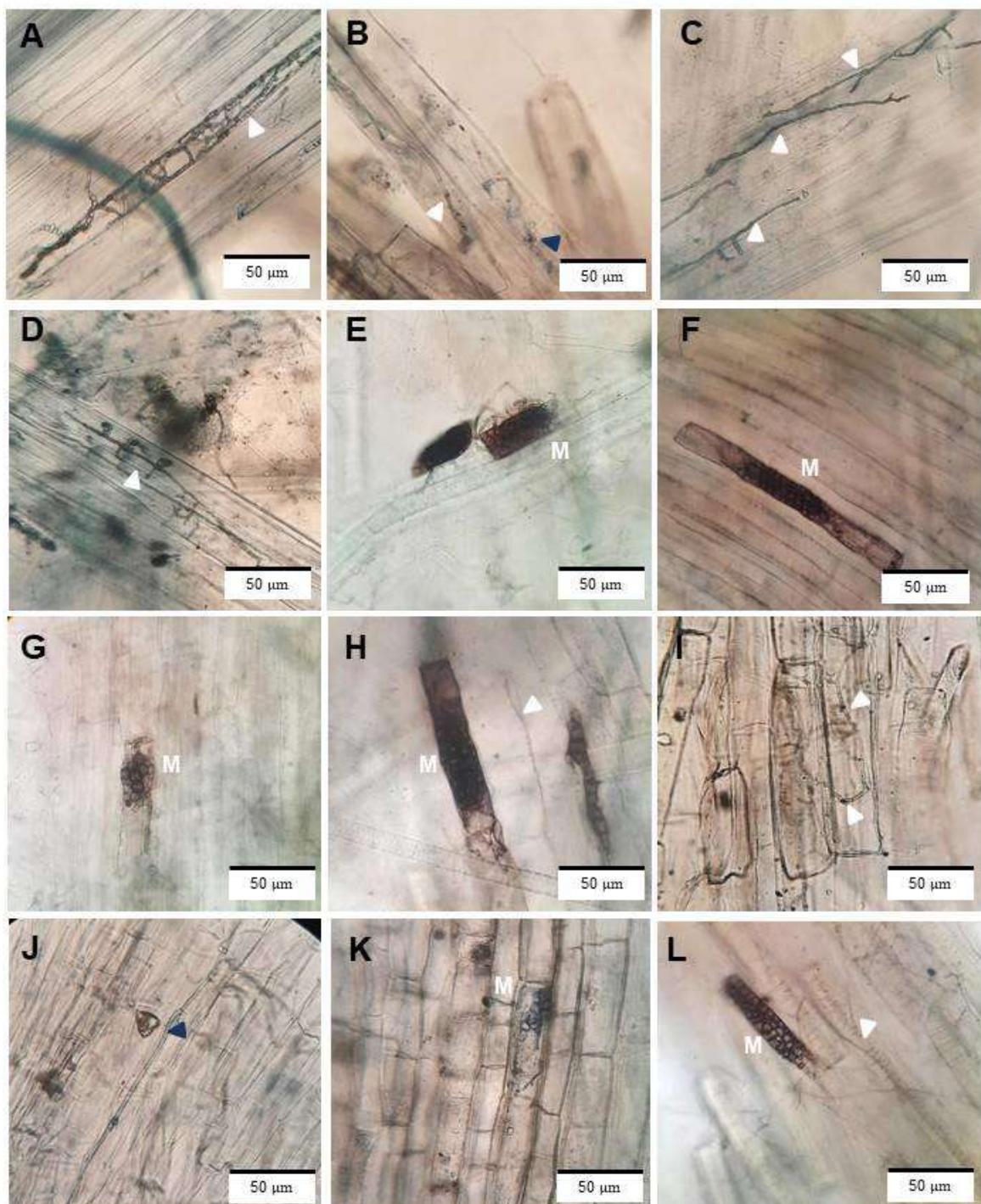


Fig. 3.13. Imágenes correspondientes a raíces de *Bromus auleticus* teñidas con Trypan Blue. Asociadas o no a *Epichloë* (E+/E-), inoculadas o no con *T. blackeriella* (DSE+/DSE-) y con el agregado o no de fósforo (P+/P-). Las imágenes A, B, C y D, corresponden a raíces de plantas E-/DSE+/P+. Las imágenes E; F; G, corresponden a raíces de plantas E+/DSE+/P+. Las imágenes H; I, corresponden a raíces de plantas E-/DSE+/P-. Las imágenes J; K; L, corresponden a raíces de plantas E+/DSE+/P-. A- Hifas septadas oscura (flecha blanca). B- Hifas septadas oscura (flecha blanca) y hialinas (flecha azul). C- Hifa septada oscura (flecha blanca). D-Hifa septada oscura (flecha blanca). E- Microesclerocio (M). F- Microesclerocio (M). G- Microesclerocio (M). H-Microesclerocio (M) e hifas septadas melanizadas (flecha). I- Hifa septada oscura (flecha). J- Hifa septada hialina (flecha azul). K- Microesclerocio hialino (M) . L- Hifa septada oscura (flecha) y microesclerocio (M). A: 400x

Hifas septadas hialinas

Se observó presencia de HSH en prácticamente todas las plantas analizadas (**Fig. 3.13. B; J**). El análisis reveló que la adición de fósforo tuvo un efecto positivo y significativo en la colonización por HSH ($Lrt= 7.9$, $p=0.005$). Como se observa en la **Fig. 3.14.**, las plantas del tratamiento E+P+ presentaron una colonización por HSH tres veces mayor que las plantas del tratamiento E+P-, lo cual destaca el efecto positivo de este factor. De manera similar, las plantas acondicionadas en el tratamiento E-P+ mostraron una colonización dos veces mayor que las plantas E-P-. No se encontraron efectos significativos atribuibles al estatus endofítico de *Epichloë* ($Lrt=0.13$, $p= 0.72$), sin embargo, la interacción entre ambos factores resultó ser significativa ($Lrt=8.81$, $p=0.032$), lo que indica la necesidad de analizar los resultados en función de cada tratamiento específico.

Es importante destacar que el tratamiento con mayor desarrollo de HSH fue el E+P+, por lo que habría una promoción de esta variable por la adición de P, además de la asociación de *B. auleticus* con endofitos *Epichloë*.

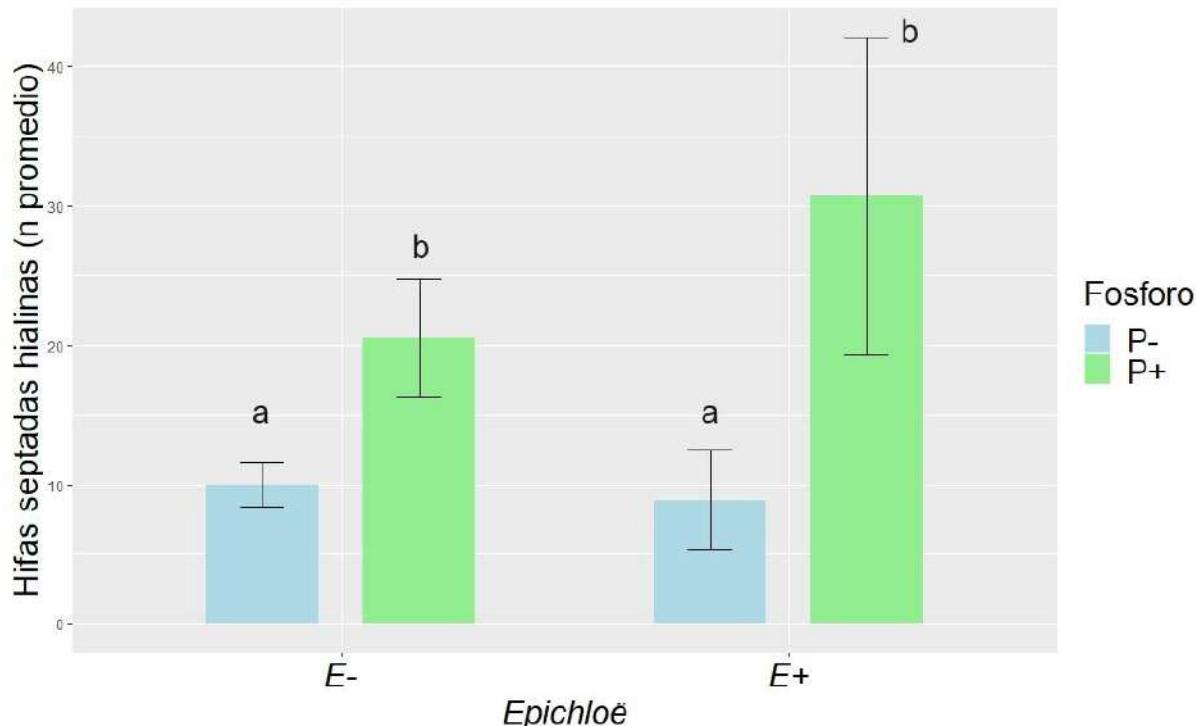


Fig. 3.14. Colonización por hifas septadas hialinas en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE). Los valores representan la media \pm error estándar de las variables analizadas. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Hifas septadas oscuras

Las hifas septadas oscuras se encontraron en todas las plantas analizadas (**Fig. 3.13 A; B; C; I**), con una frecuencia cinco veces mayor a las HSH. La adición de fósforo tuvo un efecto positivo y significativo en la colonización por HSO (LRT= 4.16, $p=0.04$). No se observaron efectos significativos relacionados con el estatus endofítico de *Epichloë* (LRT=0.67, $p= 0.41$); sin embargo, la interacción entre los factores fue significativa (LRT=13.3, $p=0.004$), indicando la necesidad de un análisis detallado por tratamiento. Como se observa en la **Fig. 3.15** las plantas del tratamiento E+P+ presentaron la mayor colonización por HSO, siendo siete veces superior a las plantas del tratamiento E+P-. A diferencia de la variable HSH, en el caso de las HSO no se observan diferencias entre la colonización de las plantas de los tratamientos E-P+ y E-P-, ni entre éstas y las plantas del tratamiento E+P+, aunque este último mostró los valores absolutos más altos. Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas atribuibles a la colonización por *Epichloë*, se destaca una notable diferencia en la colonización entre las plantas E+ y E- sin la adición de fósforo, siendo la abundancia de HSO cinco veces mayor en las plantas E-.

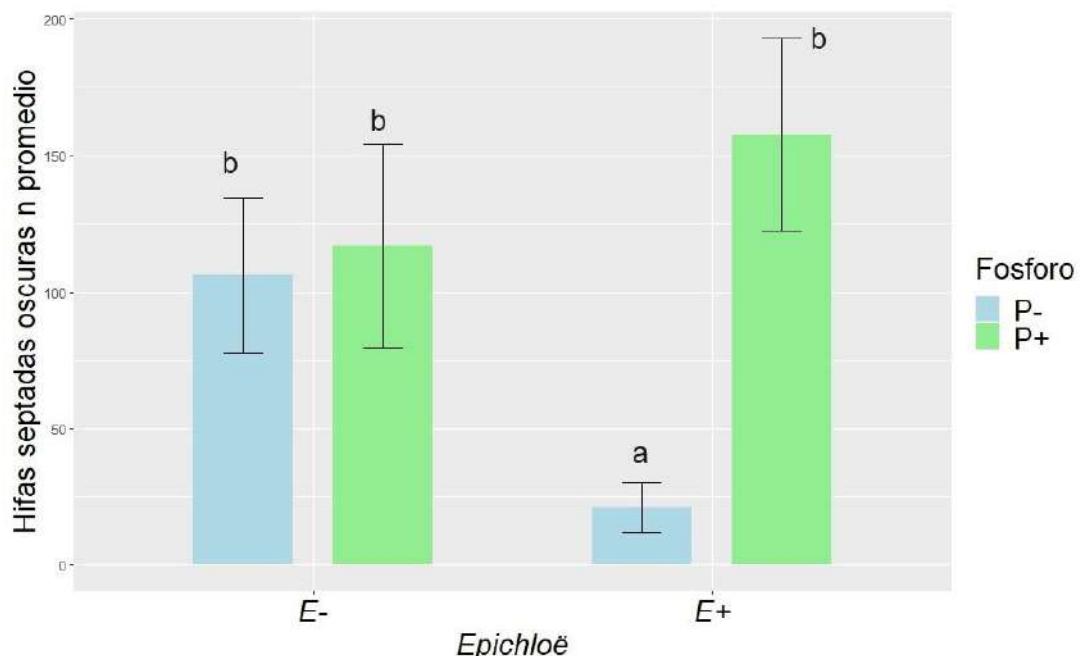


Fig. 3.15. Colonización por hifas septadas oscuras en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE).

Microesclerocios

Los M no se encontraron en todas las plantas analizadas, pero sí en todos los tratamientos (**Fig. 3.13. E; F; G; K; L**). Aunque no se observó un patrón claro, su abundancia fue menor en comparación a las HSH y las HSO, siendo el menor valor registrado en plantas E-. La adición de P tuvo un efecto positivo y significativo en la colonización por M ($LRT= 5.45$, $p=0.02$). No se observaron efectos significativos atribuibles al estatus endofítico de *Epichloë* ($LRT=2.85$, $p= 0.09$); sin embargo, la interacción entre los factores fue significativa ($LRT=11.98$, $p=0.007$), lo que indica la necesidad de un análisis detallado por tratamiento (**Fig. 3.16**).

Al igual que en las variables anteriormente analizadas, las plantas del tratamiento E+P+ mostraron la mayor colonización por M, siendo entre siete y dieciocho veces superior a las plantas de los demás tratamientos. Además, en concordancia con las otras variables, la mayor diferencia se observa entre el tratamiento E+P+ y E+P-. No se observaron diferencias en la colonización entre plantas de los tratamientos E-P+ y E-P-, ni entre éstas y las plantas del tratamiento E+P-. Esto muestra un patrón diferencial para cada variable analizada, destacando la variabilidad en la respuesta de las plantas bajo diferentes condiciones de tratamiento.

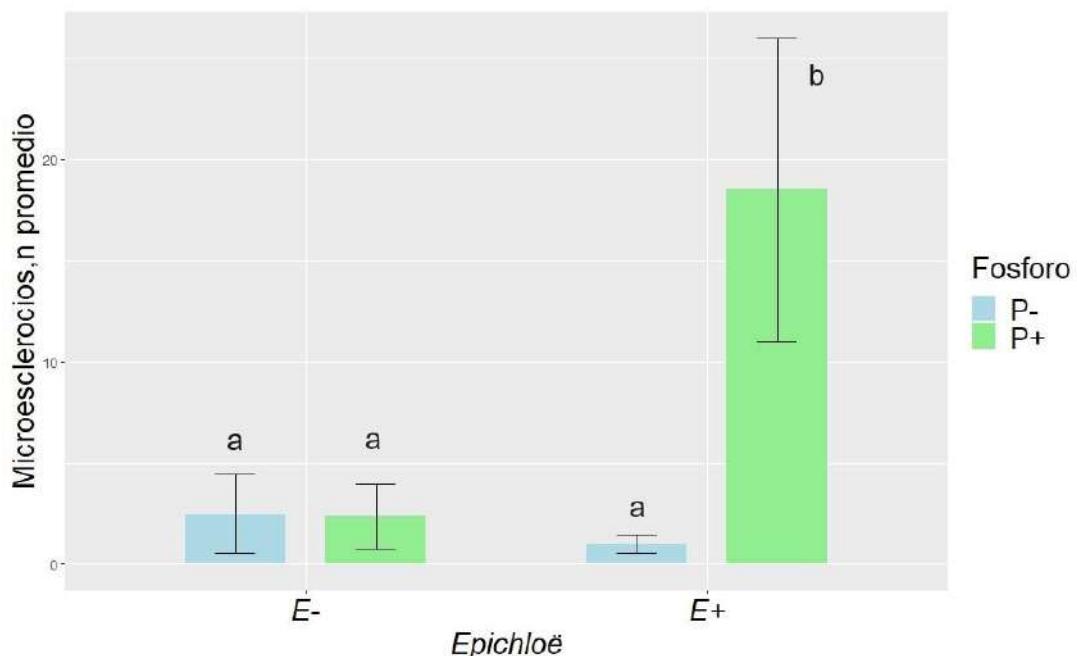


Fig. 3.16. Colonización por microesclerocios en plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* (E+) o no asociadas (E-), cultivadas con (P+) o sin (P-) el agregado de fósforo como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las barras representan el promedio del número de estructuras registradas para cada tratamiento. Las barras de error representan el Error Estándar (SE).

Re-aislamiento de *T. blackeriella*

A través del protocolo de aislamiento de endófitos de raíz, se confirmó la inoculación de *Thelonectria blackeriella* en plantas de *Bromus auleticus*. Además, al trabajar en un sistema abierto, se aislaron otros cultivos fúngicos afines a *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. y morfotipo anaranjado . (Fig. 3.17.).

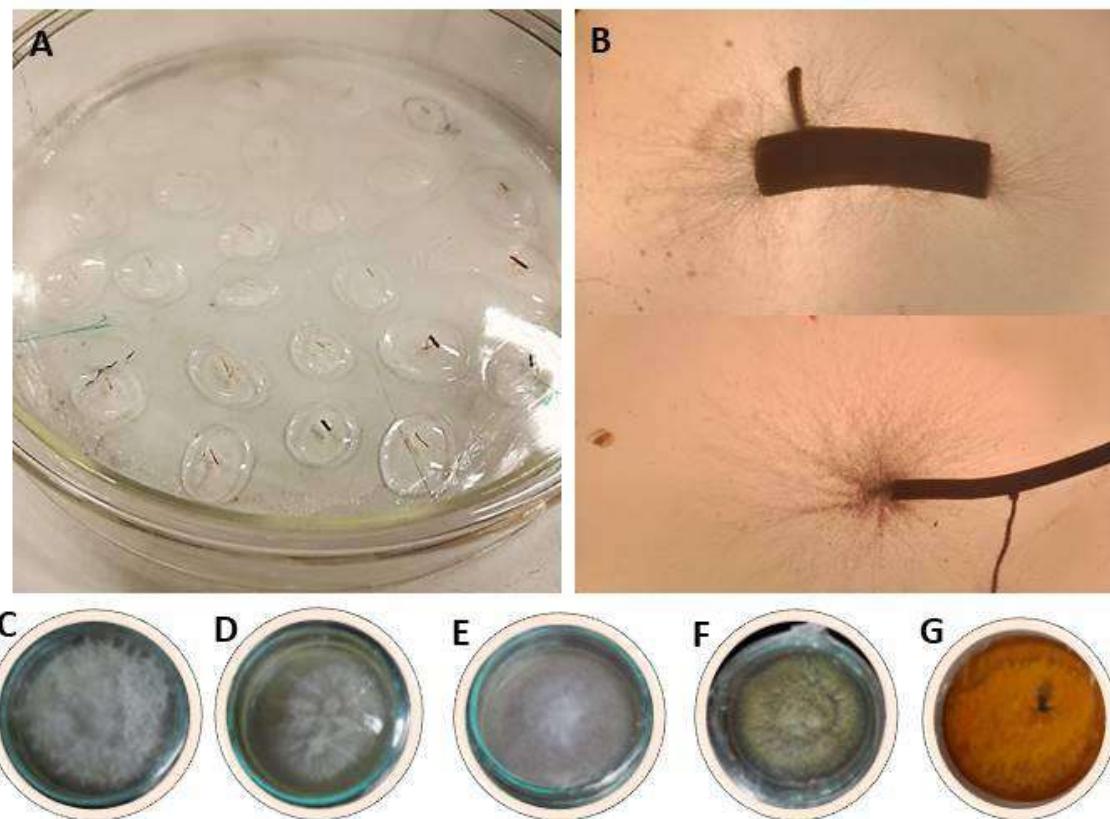


Fig 3.17. Diferentes etapas del re-aislamiento de la cepa inoculada a partir de raíces de *Bromus auleticus*. **A.** Trozos de raíces en gotas de Gel-Gro. **B.** Micelio emergiendo del interior de las raíces. Observación a lupa binocular A: 30 X. **C; D; E; F;** y **G.** Cultivos fúngicos que presentaron mayor frecuencia. **C** y **D.** *Thelonectria blackeriella*. **E.** Potencial *Fusarium* sp. **F.** Potencial *Trichoderma* sp. **G.** Morfotipo anaranjado.

Estatus endofítico de *Epichloë*

La asociación con endófitos *Epichloë* se confirmó en todas las plantas analizadas, verificando así su estatus endofítico al final del ensayo.

A continuación, se analizaron las correlaciones entre diferentes variables.

Correlación entre las variables de crecimiento y la concentración de fósforo en las plantas

A partir de la matriz de p-valores obtenida entre las variables de crecimiento y concentración de P, se detectó una correlación positiva y significativa entre las variables de crecimiento (peso fresco de vástago peso fresco de raíz, peso seco de vástago y peso seco de raíz), sin observarse una correlación significativa entre estas variables y largo de vástago, índice de verdor ni la concentración de fósforo en la planta (**Fig. 3.18**).

P						
0.11	CL					
0.15	0.31	LV				
-0.05	-0.02	0.18	PFV			
0.05	0.16	0.25	0.47 **	PFR		
-0.03	-0.00	0.12	0.68 ***	0.63 ***	PSV	
0.08	0.13	0.19	0.36 *	0.96 ***	0.64 ***	PSR

Fig. 3.18. Matriz de correlación entre variables de crecimiento y concentración de fósforo en la planta. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 39 datos entre las variables: P= concentración (mg) de fósforo en el vástago, CL=índice de verdor, LV=largo de vástago, PFV= peso fresco de vástago, PFR=peso fresco de raíz, PSV=peso seco de vástago y PSR=peso seco de raíz. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).

Correlación entre variables de crecimiento y estructuras de colonización de *T. blackeriella*

A partir de la matriz de p-valores obtenida entre las variables de crecimiento y las estructuras que *T. blackeriella* desarrolla durante la colonización de la raíz, se detectó una correlación positiva y significativa entre HSH y M ($p = 0.014$), mientras que se observó una correlación negativa entre HSH y PSV ($p = 0.038$). Además, HSO presenta una correlación positiva y significativa con PFV ($p = 0.023$). En congruencia con la matriz de variables de crecimiento y de P en las plantas, se detectó una correlación positiva y significativa entre todas las variables de crecimiento, siendo $p < 0.0005$ en prácticamente todos los casos (**Fig. 3.19**).

HSH									
0.24	HSO								
0.47 *	0.20	M							
-0.04	-0.09	-0.01	CL						
-0.23	0.32	-0.27	0.26	LV					
-0.29	0.44 *	-0.04	-0.35	0.14	PFV				
-0.28	0.23	-0.19	-0.22	-0.06	0.64 ***	PFR			
-0.40 *	0.21	-0.29	-0.31	-0.01	0.78 ***	0.82 ***	PSV		
-0.30	0.16	-0.24	-0.22	-0.06	0.55 **	0.98 ***	0.82 ***	PSR	

Fig. 3.19. Matriz de correlación entre variables de crecimiento y estructuras de *T. blackeriella*. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 27 datos entre las variables: HSH=hifas septadas hialinas, HSO=hifas septadas oscuras, M=microesclerocios, CL=índice de verdor, LV=largo de vástago, PFR=peso fresco de raíz, PFV= peso fresco de vástago, PSV=peso seco de vástago y PSR=peso seco de raíz. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).

Correlación entre variables de crecimiento, fósforo y estructuras de *T. blackeriella*

Nuevamente, y en concordancia con las matrices anteriores, se detectó a partir de la matriz de p-valores obtenida de las variables de variables de crecimiento, fósforo y estructuras de *T. blackeriella*, una correlación positiva y significativa entre todas las variables de crecimiento analizadas. En relación a las estructuras de colonización de raíz de *T. blackeriella* se observó una correlación positiva y significativa entre HSH y M. Asimismo, se registraron correlaciones negativas y significativas entre HSH y las variables de crecimiento PFV, PFR, PSV y PSV, así como entre M y PSV. Por otro lado, se detectó una correlación positiva y significativa entre HSO y LV (**Fig 3.20**). Es importante destacar que aunque en las matrices anteriores muchas de estas correlaciones no fueron significativas, en prácticamente todos los casos las tendencias fueron consistentes, lo que respalda los resultados generales.

P										
-0.14	HSH									
-0.17		-0.07	HSO							
0.43		0.57		0.04	M					
0.14		0.14		0.23	0.24	CL				
-0.12		-0.28		0.64	-0.29	0.21	LV			
0.04			-0.75		0.37	-0.27	-0.12	0.34	PFV	
0.14			-0.60		0.18	-0.46	-0.05	0.19	0.59	PFR
-0.01			-0.82		0.12	-0.68	-0.09	0.29	0.72	PSV
0.18			-0.58		0.09	-0.51	-0.09	0.15	0.47	PSR
		*				*			***	**

Fig. 3.20. Matriz de correlación entre variables de crecimiento, las estructuras de *T. blackeriella* y la concentración de P en la planta. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson calculados para 14 datos entre las variables: P= concentración de P (mg) en el vástago, HSH=hifas septadas hialinas, HSO=hifas septadas oscuras, M=microesclerocios, CL=índice de verdor, LV=largo de vástago, PFR=peso fresco de raíz, PFV= peso fresco de vástago, PSV=peso seco de vástago y PSR=peso seco de raíz. Se extrajeron los valores de p que se expresan como: *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005. Las celdas de la matriz se colorean en función del valor del coeficiente de correlación. Paleta de colores: "azul oscuro" (correlación negativa fuerte), "turquesa" (correlación positiva fuerte), "blanco" (sin correlación).

DISCUSIÓN

Aunque muchas gramíneas albergan diversos hongos simbiontes, el análisis integrado de múltiples simbiontes coexistiendo en la misma planta rara vez se realiza y más aún el análisis del comportamiento de las cepas endofíticas. Las simbiosis simultáneas pueden generar una variedad de efectos en la aptitud de la planta hospedante, y las interacciones entre las distintas especies de simbiontes pueden influir significativamente en la dirección y magnitud de estos efectos, de ahí la importancia en la comprensión de estas interacciones para luego evaluar su impacto en el crecimiento y desarrollo vegetal (Afkhami *et al.*, 2014; Larimer *et al.*, 2014).

En este trabajo, se evaluó el efecto de la interacción entre *Bromus auleticus* y dos endofitos: *Epichloë platensis* y una cepa de *Thelonectria blackeriella* (clasificada como DSE), aislada previamente de las raíces del mismo hospedante e identificada molecularmente. Como segundo factor de estudio, se incorporó el agregado de una fuente de fósforo ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Las preguntas centrales fueron si la asociación de *B. auleticus* con *Epichloë* influye en la colonización de la especie DSE y si, al ser una cepa solubilizadora de P, esta interacción tripartita (*B. auleticus-Epichloë-DSE*) afecta la concentración de P en los tejidos aéreos de la planta. Finalmente, se exploró el impacto de ambas asociaciones simbióticas en los caracteres de crecimiento de *Bromus auleticus*.

Colonización de raíces por *T. blackeriella*

En este estudio se observaron las estructuras fúngicas características de los hongos DSE, como hifas septadas oscuras (HSO), hifas septadas hialinas (HSH) y microesclerocios (M), en los tratamientos correspondientes a plantas inoculadas con *T. blackeriella* (DSE+). Entre las estructuras, las HSO fueron las más abundantes, superando en un 82% a las HSH y en un 93% a los M.

Los patrones de abundancia variaron entre las estructuras analizadas, manteniéndose como constante el efecto positivo y significativo del agregado de P especialmente en las plantas E+. Para los M se detectó un incremento significativo en las plantas E+ en comparación con las E- únicamente en el tratamiento con P. En contraste, para las HSH los valores en plantas con adición de P fueron significativamente superiores tanto en los tratamientos E+ como E-. A diferencia de

la variable HSH en ausencia de P, las plantas E- presentaron una abundancia de HSO cinco veces mayor en comparación con las plantas E+. Los resultados obtenidos sugieren que la colonización por *T. blackeriella* es promovida por P. Mientras que en los M, se observa no sólo el efecto de la adición de P, sino la promoción por parte de *Epichloë*.

Estos resultados coinciden parcialmente con estudios previos que analizaron la influencia del nitrógeno y fósforo en el suelo sobre la dinámica de colonización de DSE en plántulas nativas de *Poa labillardierei*, a través de experimentos de campo y de invernadero. En dicho estudio, la colonización por DSE fue mayor en suelos con altos nutrientes, pero no varió en los tratamientos de invernadero, lo que llevó a los autores a sugerir que el nitrógeno y el fósforo tienen un efecto mínimo sobre la colonización de DSE (Jones & French 2021). Estos resultados coinciden con otros estudios que tampoco han encontrado una relación entre los niveles de fósforo y la colonización por DSE (Newsham, 2011; Kivlin *et al.*, 2013; Ranelli *et al.*, 2015). Dadas las diferencias encontradas en nuestro trabajo y en estudios previos sobre el efecto del P en la colonización por DSE, es pertinente continuar investigando en esta línea.

Como se mencionó en la sección resultados, no se encontraron diferencias significativas atribuibles a la asociación de *B. auleticus* con *Epichloë*. Sin embargo, cabe destacar que los mayores valores de colonización se observaron en los tratamientos E+/P+, lo cual también coincide con la interacción significativa entre los factores mencionados. Estudios sobre la colonización de hongos DSE en gramíneas asociadas a endofitos de vástago muestran resultados variados. Vandegrift *et al.*, (2015) reportaron menor colonización de DSE en plantas E- de *Agrostis capillaris* y *Bromus hordeaceus*. Slaughter *et al.*, (2019) no detectaron efectos del estatus endofítico ni del genotipo simbiótico en la colonización radicular por DSE en *Schedonorus arundinaceus*. Por otro lado, Terlizzi *et al.*, (2022) analizaron el efecto de la asociación, a campo, de *B. auleticus* con *Epichloë* sobre la colonización por DSE, detectándose una mayor abundancia de M en plantas E+ respecto a las E-. Asimismo, podemos comparar los resultados obtenidos en el capítulo 2, cuando *B. auleticus* fue inoculada con *S. terrestris* y ver algunas tendencias, que resultan interesantes, y se mantienen en este ensayo como una mayor abundancia de HSH,

HSO y M cuando las plantas están asociadas a *B. auleticus*, sugiriendo una posible modulación de *Epichloë* sobre la colonización de DSE.

Dadas las diferentes condiciones de ambos estudios (campo versus ensayo en maceta, *T. blackeriella* frente a diversidad a campo, tipo de suelo y condiciones ambientales), una comparación directa es impracticable. A partir de los resultados obtenidos en este estudio sugerimos que una mayor disponibilidad de P podría minimizar la competencia entre ambos simbiontes fúngicos por este recurso o compuestos derivados. Además, si la cepa de DSE resulta beneficiosa, por ejemplo, al solubilizar P y hacerlo más disponible para las plantas, es posible que su asociación sea promovida por los endofitos *Epichloë*, como hemos observado en otros estudios con hongos micorrílicos arbusculares en gramíneas nativas (Novas *et al.*, 2005, 2009, 2011; Arrieta *et al.*, 2015; Vignale *et al.*, 2016, 2018, 2020).

A su vez, estos resultados se pueden relacionar con el ensayo de exudados de *Epichloë* (Capítulo 2), en condiciones *in vitro*, los exudados de *Epichloë* mostraron un efecto variable sobre el crecimiento de *T. blackeriella* en función de la concentración y el tiempo de exposición, lo que indica que la interacción puede ser dinámica y sensible a factores externos. Sin embargo, en este ensayo en condiciones de invernadero y con disponibilidad de P, *Epichloë* presentó una efecto diferencial en la dinámica de P sobre la colonización de *T. blackeriella*. Estos hallazgos sugieren que la interacción entre *E. platensis* y *T. blackeriella* puede ser modulada por la disponibilidad de nutrientes, como el P. Es posible que en ambientes con alta disponibilidad de P, el efecto de los exudados de *Epichloë* sea menos pronunciado.

Sería interesante investigar más a fondo esta interacción en diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes para comprender mejor los mecanismos involucrados.

Concentración de P en los tejidos aéreos de las plantas

Al analizar la concentración de P en el vástago, se observó una tendencia hacia menores niveles de P en las plantas que fueron inoculadas con *T. blackeriella*, excepto en el tratamiento E+DSE+P+, donde se revierte esta tendencia. Esto sugiere que la respuesta de este parámetro frente a la presencia de *Epichloë* y la adición de P, modula la actividad de *T. blackeriella*.

La menor concentración de P en el vástago cuando la planta está asociada simultáneamente con ambos simbiontes, sin P adicional en el suelo, podría explicarse por un mayor consumo y competencia por el P disponible, lo cual reduce la cantidad de este nutriente que llega al vástago. Además, es posible que el P se esté acumulando en otros tejidos, como las raíces, en formas que podrían liberarse o translocarse al vástago en fases posteriores del crecimiento (Cardozo *et al.*, 2024). También se plantea la posibilidad de un "consumo de lujo" de P, en el que las plantas absorben más P del necesario para su crecimiento inmediato. *B. auleticus* podría estar almacenando este exceso de P en tejidos como las raíces, lo que explicaría la falta de correlación entre las concentraciones de P en el vástago y el crecimiento. Este almacenamiento en las raíces puede ser una estrategia adaptativa que permita a la planta regular la disponibilidad de nutrientes, manteniendo reservas que pueden ser movilizadas cuando el crecimiento del vástago lo demande. Estudios previos han demostrado que la co-inoculación de HMA y DSE en *Trifolium repens* generaron un aumento de P en la rizósfera por parte de los DSE, mientras que los HMA aumentaron la transferencia de P al hospedante (Della Mónica *et al.*, 2015). Estudios futuros deben realizarse teniendo en cuenta la incorporación de HMA que faciliten la absorción de P por parte de los DSE, ya que esta incapacidad se ha atribuido en ciertos casos, a que estos carecen de estructuras especializadas para el intercambio de nutrientes, aun así su presencia suele incrementar la concentración de P en vástago (Newsham 2011).

En cuanto a los parámetros de crecimiento en *B. auleticus*, no se encontró una correlación significativa entre estos y la concentración de P en el vástago. Esto sugiere que la acumulación de P en las plantas no estaría directamente vinculada al crecimiento, sugiriendo la influencia de otros factores en el desarrollo de la planta. Como se ha mencionado en la introducción de este Capítulo, Cardozo *et al.*, (2024) destacan que la disponibilidad de P no siempre es el factor limitante para el crecimiento de las plantas en ecosistemas de pastizales de la Cuenca del Río de la Plata y sugieren que la disponibilidad de nitrógeno podría ser un factor limitante en los pastizales, evidenciado por la baja relación N:P observada. Es posible que *B. auleticus* también esté experimentando una limitación de nitrógeno u otros nutrientes, o que factores abióticos como la disponibilidad de agua o la temperatura estén influyendo en su crecimiento.

Efecto de interacción *Epichloë*-DSE sobre parámetros de crecimiento de *B. auleticus*

Al evaluar los parámetros de crecimiento de *B. auleticus*, no se observaron diferencias significativas en el largo del vástago, el peso fresco y seco del vástago y la raíz. Sin embargo, se detectaron algunas tendencias relevantes, aunque variables dependiendo de las combinaciones de simbiontes y el agregado o no de P, lo que deja en evidencia la complejidad de las interacciones. En el peso fresco del vástago, se registraron valores superiores con la adición de P, alcanzando un incremento del 16% respecto a las plantas sin P. El valor absoluto más alto se registró en las plantas bajo el régimen E-/DSE+/P-, las cuales alcanzaron un 38% más de peso en comparación con las E-/DSE-/P-. Es interesante resaltar que el peso fresco de vástago fue mayor en las plantas E- cuando *B. auleticus* estaba asociada con *T. blackeriella*, mientras que las plantas E+ los valores se mantuvieron similares independientemente de la asociación con *T. blackeriella* o de la adición de P. Esto indicaría que es la asociación con endofitos *Epichloë* la que le resultaría en un mayor costo al hospedante. Estudios realizados en *B. auleticus* con *E. tembladera* y *E. pampeana* que observaron un efecto positivo en los parámetros de crecimiento (Novas *et al.*, 2003; Iannone y Cabral 2006; Iannone *et al.*, 2012) en otros casos, los endofitos presentaron un efecto neutral o negativo (Faeth *et al.*, 2010) o los efectos dependieron de los genotipos del hospedante y las condiciones abióticas (Ahlholm *et al.*, 2002). Algunos autores han sugerido que la simbiosis con *Epichloë* implica un costo energético para la planta, debido a la demanda de recursos que estos endofitos imponen, especialmente en condiciones de limitada disponibilidad de nutrientes como el P (Saikkonen *et al.*, 1998; Clay y Schardl, 2002). Otros estudios también indican que, aunque *Epichloë* puede ofrecer ventajas en términos de resistencia a factores de estrés o protección contra herbívoros, en algunas condiciones de cultivo estos beneficios no compensan el costo de la asociación, afectando el balance de nutrientes en el hospedante (Malinowski y Belesky, 2000). Aunque en este estudio se adicionó P, podría plantearse la hipótesis de que la concentración no fue suficiente, sin embargo, algunos resultados muestran un aumento de peso en los tratamientos con adición de P, lo que nos lleva a pensar en la hipótesis antes mencionada, que el P podría estar acumulándose en otros tejidos

del hospedante. Además, durante el experimento en maceta, las plantas fueron atacadas por pulgones, lo que pudo haber desencadenado una respuesta defensiva tanto en *Epichloë* como en la planta, redirigiendo recursos hacia la defensa en lugar de al crecimiento o almacenamiento de nutrientes.

Para el peso seco del vástago las plantas inoculadas con *T. blackeriella* mostraron mayores valores, con incrementos del 13%, 15% y 7% en comparación con los tratamientos E-/DSE-/P-, E+/DSE-/P- y E-/DSE-/P+, respectivamente. La excepción fue el tratamiento E+/DSE+/P+, que tuvo un 5% menos de peso seco en comparación con su control sin DSE. En este parámetro, se observa una tendencia similar a la ya vista para peso fresco de vástago, donde los mayores valores parecen estar asociados a la simbiosis con *T. blackeriella*. Asimismo, la adición de P parece compensar el costo de la simbiosis con *Epichloë*. Como se ha mencionado en el capítulo 2 hay antecedentes, que demostraron la capacidad *in vitro*, de hongos DSE, de solubilizar una fuente de P, como la utilizada en este ensayo, (Spagnoletti *et al.*, 2017, Echeverría *et al.*, 2024), esta capacidad podría estar contribuyendo a la tendencia a mayores pesos secos del vástago. Los resultados también son en parte consistentes con estudios realizados en otras especies vegetales, como el maíz, donde la inoculación con hongos DSE (*Gaeumannomyces cylindrosporus*) mostró mejoras en el rendimiento y crecimiento en condiciones de estrés, con diferentes concentraciones de un metal pesado (Ban *et al.*, 2017). En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que los hongos DSE pueden desempeñar un papel importante en la mejora del crecimiento vegetal y en la adaptación a condiciones ambientales desafiantes, siempre que las condiciones de nutrientes sean adecuadas para apoyar estas asociaciones simbióticas.

En cuanto a la raíz, el peso fresco fue mayor en las plantas E+ con la adición de P, independientemente de la inoculación con *T. blackeriella*. Mientras que para el peso seco, si bien se ven valores superiores en el tratamiento con P, no es tan claro el efecto debido a *Epichloë*. Es probable que las diferencias observadas entre peso fresco y seco sean debidas a diferentes concentraciones de agua en las raíces. Según los estudios revisados por Dastgoer y Wylie (2017), la colonización por endofitos puede mejorar significativamente la tolerancia de las plantas al estrés por sequía. Estos autores sugieren que los hongos no micorrílicos (como los endófitos

foliares) podrían mediar los efectos del estrés hídrico ajustando, regulando o modificando las actividades fisiológicas, bioquímicas y metabólicas de las plantas. En concordancia, plantas de *Jatropha curcas* asociadas a endofitos presentaron un mejor estado hídrico que las E- (D'Jonsiles *et al.*, 2018). Por otro lado, Arnold y Engelbrecht (2007) observaron que en *Theobroma cacao* las hojas infectadas con una densidad y diversidad natural de endofitos exhiben casi el doble de tasas de pérdida de agua en comparación con las hojas no infectadas.

El estudio de interacciones múltiples es escaso en lo que respecta a la combinación *Epichloë*-DSE-gramínea-P, centrándose en otros hospedantes y en la combinación de microorganismos como HMA, HSF y bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB). Tal es el caso de Della Monica *et al.*, (2015) cuyos resultados mostraron un posible efecto sinérgico entre DSE y HMA, ya que los primeros incrementarían la reserva de P en la rizósfera y los HMA transfieren el P a la planta hospedante. Mientras Stefanoni Rubio (2019) evaluó la interacción de *Epichloë*-HSF-*B. auleticus*, cuyos resultados no mostraron aumento significativo de biomasa debido a la inoculación y/o agregado de P. En el caso de otros microorganismos, Saxena *et al.*, (2015) observaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento de plantas de garbanzo al inocular HSF (*Aspergillus niger*) y PSB (*Bacillus* sp.) con el agregado o no de P, siendo mejores las inoculaciones simultáneas respecto de las simples. Mientras que Li *et al.*, (2021) estudiaron hongos aislados a partir de suelos abandonados los cuales fueron caracterizados como solubilizadores de P (*Penicillium oxalicum*, *Aspergillus brunneoviolaceus*) e inoculados en plantas de berenjenas demostrando el potencial como hongos promotores de crecimiento.

En nuestro modelo *Thelonectria blackeriella*, se ha comportado como solubilizador de P *in vitro* respecto a otras cepas seleccionadas (Capítulo 2), sin embargo al cambiar las condiciones y trabajar con plantas en maceta en el invernadero, los resultados no fueron los esperados. En lo que respecta a la inoculación del hongo DSE, la misma fue confirmada con éxito al reaislarlo de las raíces de *B. auleticus*. Al analizar las tendencias, la combinación de un endofito de vástago, como *Epichloë*, y un endofito de raíz, como *Thelonectria blackeriella*, no mostró un efecto sinérgico, sin embargo, tampoco afectó negativamente la biomasa. Los resultados indicaron que los pesos fueron mayores, teniendo en cuenta la adición de P, en presencia de

uno u otro endofito por separado mientras, en algunos casos, la combinación de ambos condujo a una disminución en el peso seco de vástagos, algo similar a lo observado por Stefanoni Rubio (2019). Esto sugiere que la interacción conjunta de estos endofitos, en algunos casos, pueden competir o interferir en sus efectos beneficiosos individuales sobre el desarrollo vegetal.

Al evaluar el índice de verde de las hojas de *B. auleticus* no se observaron diferencias significativas, independientemente de la asociación con el endofito *Epichloë*, la inoculación con *T. blackeriella*, o la adición de P. La ausencia de diferencias particularmente en este último caso, resulta llamativa, dado que el P juega un papel importante en la síntesis de clorofila, ya que está involucrado en la transferencia de energía y el metabolismo celular, lo cual afecta la producción de clorofila (Kanse *et al.*, 2015). Esto puede deberse a que, en las condiciones evaluadas, los distintos factores no afectan de manera directa la síntesis o concentración de clorofila, la que está relacionada también con el contenido de N en la planta o que la interacción múltiple *Epichloë*-DSE-*B. auleticus* no impacte notablemente la salud foliar en términos de color. Nuestros resultados contrastan con estudios de coinoculación de microorganismos previos, que evaluaron el contenido de clorofila en plantas de garbanzos co-inoculadas con bacterias y HSF, mostraron diferencias significativas en plantas co-inoculadas con ambos microorganismos respecto a las plantas inoculadas con uno o control (Saxena *et al.*, 2015). Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas también puede relacionarse con la cantidad de P añadida la cual podría no haber sido limitante, o las plantas podrían haber compensado con otros mecanismos fisiológicos.

En este modelo, bajo las condiciones experimentales, no se observó un impacto de la asociación simultánea con simbiontes sobre los parámetros de crecimiento de las plantas. La colonización fúngica no siempre puede traducirse en un aumento de biomasa o crecimiento de la planta. La capacidad de los DSE para mejorar el crecimiento de la planta hospedante depende tanto de la especie hospedante como de su estado metabólico. Por ejemplo, en un estudio de Haselwandter y Read (1982), la inoculación de las raíces de plántulas de *Carex firma* y *C. curvula* cultivadas en condiciones *in vitro* con DSE resultó en un aumento significativo de la producción de materia seca en *C. firma*, mientras que en *C. curvula* no se observó un efecto similar. Este hallazgo subraya cómo la respuesta a la colonización por

DSE puede variar incluso entre especies estrechamente relacionadas. Si bien, en la simbiosis mutualistas ambos simbiontes obtienen ventajas, el hospedante se beneficia de estas interacciones no sólo con un mejor crecimiento (Schulz y Boyle 2005). En el caso de *T. blackeriella* las hifas, junto con los M son las únicas estructuras que los hongos DSE suelen formar en las células radiculares, que actúan como estructuras en reposo o propágulos (Peterson *et al.*, 2008; Upson *et al.*, 2009). Ambas estructuras en las células de la raíz carecen de membrana perifúngica y de material de matriz interfacial, lo que sugiere que no son interfaces especializadas para la transferencia de nutrientes. Por lo tanto, algunos autores postulan que es improbable que la colonización de las raíces por DSE esté directamente relacionada con el rendimiento de la planta (Newsham 2011). Sin embargo, aunque ciertas asociaciones forman estructuras de interfaz especializadas, como arbúsculos y redes de Hartig, otras se limitan a hifas intracelulares o intercelulares no especializadas en las raíces y en cualquiera de los casos, existen ejemplos documentados de intercambio activo de nutrientes, lo que refuerza el hecho de que las estructuras especializadas utilizadas para definir asociaciones micorrízicas específicas no son esenciales para el intercambio recíproco de nutrientes y la promoción del crecimiento de las plantas (Kariman *et al.*, 2018). En el caso de los endofitos *Epichloë*, tampoco observamos efectos significativos sobre la biomasa. Sin embargo, en estudios previos mencionados previamente, en invernadero y a campo indicaron que las plantas de *B. auleticus* asociadas con *Epichloë* producen más biomasa y semillas y son más resistentes a la defoliación continua que las plantas sin endófito (Novas *et al.*, 2003; Iannone y Cabral 2006; Iannone *et al.* 2012; Vignale *et al.*, 2018; 2020; 2023).

Los resultados respaldan la complejidad de las interacciones planta-simbiontes y muestran que el beneficio o costo de estas asociaciones puede depender de factores como la disponibilidad de nutrientes y la presencia de estrés abiótico o biótico. En este caso, el ataque por pulgones durante el experimento podría haber influido en la redistribución de recursos hacia mecanismos de defensa, limitando el efecto positivo de los simbiontes en el crecimiento. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar múltiples factores y condiciones experimentales, como ensayos a campo, diferentes tiempos para la cosecha y mediciones de parámetros de crecimiento, así como también considerar la concentración de nitrógeno en el

suelo y en la planta, y la posibilidad de incorporar al sistema otro simbionte como los HMA que faciliten el ingreso de nutrientes a la planta. Consideramos que más allá de ello, los resultados de este capítulo constituyen un gran aporte al estudio de interacciones múltiples y subrayan la complejidad de las mismas. Será necesario complementar con nuevos ensayos para alcanzar una visión integral del papel de los endofitos en el desarrollo vegetal y su potencial aplicación en agricultura.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Los resultados no corroboraron que la asociación *Epichloë platensis-Thelonectria blackeriella* favorezca parámetros de crecimiento en *B. auleticus* como longitud de vástago, peso fresco y seco de vástago y raíz.
- La asociación *E. platensis-B. auleticus* favorece el establecimiento de *T. blackeriella*, lo que se refleja en un aumento en la abundancia de sus estructuras como los microesclerocios.
- La inoculación del hongo DSE en plantas de *B. auleticus* no promovió la solubilización de P de manera significativa, o al menos, esto no se reflejó en un aumento en las concentraciones de P en el vástago.

DISCUSIÓN GENERAL

Tal como se expuso en la **Introducción General**, las plantas establecen interacciones simultáneas con una amplia diversidad de microorganismos, cuyos roles pueden ser descriptos bajo el paradigma del “continuo mutualismo-parasitismo” (Barrow, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Mandyam y Jumpponen, 2015). En las simbiosis mutualistas, ambos organismos obtienen beneficios: la planta ofrece refugio y compuestos de carbono al microorganismo, obteniendo a cambio mayor vigor, productividad y tolerancia al estrés. En este contexto, resulta plausible que los microorganismos asociados a un mismo hospedante puedan interactuar entre sí, modulando sus efectos individuales y generando un impacto diferencial en el hospedante. Entre los microorganismos que establecen simbiosis con las plantas se destacan los endofitos, definidos funcionalmente como hongos o bacterias que colonizan cualquier tejido vegetal sanos, ya sea inter o intracelularmente, y que persisten durante todo o parte del ciclo de vida sin causar síntomas de enfermedad (Petrini, 1991; Schulz y Boyle, 2005; Hardoim *et al.*, 2015).

En esta Tesis se abordó el estudio de dos tipos de endofitos con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre sus interacciones: los endofitos de vástago del género *Epichloë* y los endofitos septados oscuros (DSE) de raíz, ambos asociados a la gramínea perenne nativa *Bromus auleticus*.

Los resultados obtenidos aquí brindan información original, tanto a nivel de la triple asociación *Epichloë platensis-Bromus auleticus-DSE* como de los roles que pueden presentar los DSE, un grupo muy heterogéneo, característica que dificulta su caracterización.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan información novedosa y relevante, tanto sobre la triple asociación *Epichloë platensis-Bromus auleticus-DSE*, como sobre los roles funcionales de los DSE, un grupo altamente heterogéneo cuya caracterización presenta desafíos debido a su diversidad biológica y funcional.

La **hipótesis general** planteaba que la presencia simultánea de simbiontes funcionalmente distintos, se evidencia en la promoción de la colonización del hospedante por parte de los mismos y su efecto conjunto beneficia a las plantas hospedantes. Para contrastar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos organizados en torno a los tres objetivos generales:

- 1) Evaluar el efecto de la simbiosis *Bromus auleticus-Epichloë* sobre la identidad de las cepas DSE asociadas a las raíces del hospedante.
- 2) Evaluar los caracteres asociados al tipo de interacción que establecen los endofitos DSE con *Bromus auleticus* y determinar el efecto de los endofitos *Epichloë* sobre estos rasgos. Identificar a los endofitos DSE en términos de características beneficiosas para el hospedante.
- 3) Evaluar el efecto simultáneo de los endofitos *Epichloë* y DSE sobre el desarrollo del hospedante.

El **primer capítulo**, correspondiente al objetivo 1, se centró en la identificación de las cepas de DSE aisladas durante la realización de mi Tesina de Licenciatura, a partir de raíces de *B. auleticus*. Además, se buscó corroborar su rol endofítico y analizar la riqueza y diversidad de estos microorganismos. Para alcanzar estos objetivos, se realizaron ensayos *in vitro* de resíntesis con las distintas cepas de DSE. Los resultados evidenciaron comportamientos divergentes entre las cepas analizadas, ya que algunas resultaron endofíticas mientras que otras presentaron características patogénicas, incluso tratándose de cepas de la misma especie. Ejemplos destacados incluyen *Setophoma terrestris*, *Poaceascoma helicoides*, *Microdochium bolleyi*, *Simplicillium lamellicola* y *Herpotrichia* sp.

Las cepas que mostraron un comportamiento endofítico, fueron identificadas como *Microdochium trichocladiopsis*, *Magnaportheopsis* sp., *Dactylonectria* sp., *Thelonectria blackeriella* y *Periconia macrospinosa*. Por otro lado, las cepas identificadas como *Epicoccum* sp., *Hymenoschyphus* sp., *Tetraplosphaeria* sp. y *Exophiala tremulae* se comportaron como cepas patógenas, evidenciado por la aparición de lesiones en la parte aérea y/o raíces de las plántulas, e incluso la muerte de las mismas. Mientras que la mayoría de las especies mencionadas cuentan con antecedentes que las describen como endofíticas o patogénicas, dependiendo del hospedante y las condiciones ambientales, algunos casos se reportan por primera vez, según nuestro conocimiento. En este estudio, *Herpotrichia* sp. y *Magnaportheopsis* sp. son identificadas como endofíticas por primera vez, mientras que *Tetraplosphaeria* sp. se reporta como patógena. Estos resultados resaltan la complejidad de las interacciones planta-hongo, las cuales se mantienen a través de un equilibrio dinámico. Este equilibrio puede alterarse por factores bióticos

o abióticos desencadenando respuesta por parte de la planta o en el hongo, lo que puede modificar el resultado de la interacción (Schulz y Boyle, 2005).

Es importante destacar que las cepas identificadas fueron aisladas por primera vez de *B. auleticus*, asociadas o no a *E. platensis*, lo que constituye registro valioso de cepas autóctonas aisladas de una gramínea nativa. Entre las especies aisladas, *M. bolleyi*, *S. terrestris*, *P. helicoides* y *S. lamellicola* fueron las más frecuentes. En relación con las hipótesis planteadas, los resultados de riqueza y diversidad corroboran la hipótesis de que “*Epichloë modula la comunidad fúngica asociada a las raíces de Bromus auleticus, favoreciendo mayor diversidad y riqueza en las comunidades de hongos DSE*”. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, la presencia de *E. platensis* estuvo asociada con una mayor riqueza y diversidad de hongos DSE, resultado consistente con los estudios de Arrieta *et al.*, (2015); Garces *et al.*, (2022); Górzynska *et al.*, (2017); Vignale *et al.*, (2023). Sin embargo, no se logró detectar una combinación particular de especies asociadas a las plantas E+. Por otro lado, las cepas asociadas a las plantas E+ fueron mayoritariamente endofíticas, en contraste con las asociadas a las plantas E- que resultaron patogénicas. Este resultado permite corroborar la hipótesis sobre que “*Las plantas de Bromus auleticus asociadas a Epichloë favorecen la colonización por hongos DSE con comportamiento no patogénico*”.

En el **capítulo II**, correspondiente al objetivo general 2, se abordaron diversos aspectos de las cepas de DSE y su interacción con la asociación *Epichloë*-gramínea, de manera de analizar caracteres de interés en los microorganismos. Desde la perspectiva de usar inoculantes a base de DSE como promotores del crecimiento de plantas o agentes de biocontrol, resulta crucial seleccionar cepas adecuadas que no se vean afectadas negativamente por otros simbiontes de raíces o de vástago, que sean competitivas frente a ellos y, al mismo tiempo, no interfieran con simbiontes que otorguen beneficios de interés a las plantas. Por lo tanto, en la búsqueda de consorcios fúngicos adecuados que mejoren y protejan la biomasa vegetal, es necesario evaluar el tipo de relaciones, que pueden ser desde sinérgicas a antagónicas y establecer los factores que operan sobre ella.

Este capítulo se estructuró en cuatro secciones que abordan diferentes aspectos: ensayos *in vitro* sobre la solubilización de P, análisis de la correlación entre parámetros de crecimiento, estrategia nutricional y origen del aislamiento de cepas

de DSE, así como la evaluación de la capacidad patogénica de una cepa sobre plantas adultas de *B. auleticus*.

Los resultados obtenidos, mostraron la capacidad de solubilizar fósforo en medio sólido de seis cepas DSE identificadas como *Thelonectria blackeriella*, *Magnaportheopsis* sp., *Microdochium bolleyi*, *Herpotrichia* sp., *Tetraplosphaeria* sp., *Poaceascoma helicoides*. Teniendo en cuenta los resultados de resíntesis del capítulo I, se descartaron las cepas que mostraron comportamiento patogénico, quedando las tres cepas que resultaron endofíticas: *Thelonectria blackeriella*, *Magnaportheopsis* sp. y *Herpotrichia* sp. Entre estas, *T. blackeriella* presentó un crecimiento más homogéneo en medio sólido NBRIP, además de ser promovida *in vitro* por exudados de *E. platensis* (Capítulo II). Considerando también las irregularidades en el crecimiento observadas en las otras cepas, *T. blackeriella* fue seleccionada para los ensayos posteriores. En cuanto a su capacidad de solubilización de P en medios líquidos, mostró actividad en todos los evaluados, alcanzando la mayor solubilización en FA, seguida de TCP y, en menor medida, en FF.

Estos resultados concuerdan con otros estudios, en los cuales evaluaron la capacidad de cepas autóctonas de DSE de solubilizar distintas fuentes de fósforo inorgánico como las empleadas en este trabajo (Spagnoletti *et al.*, 2017; Rothen *et al.*, 2018; Echeverría *et al.*, 2024). A partir de nuestros resultados se corroboró la hipótesis que “*Determinadas cepas de hongos DSE tienen la capacidad de solubilizar distintas fuentes de fósforo inorgánico*”.

El análisis de correlación entre la tasa de crecimiento, estrategia nutricional (endofítica/patogénica), las estructuras fúngicas, el diámetro alcanzado y el estatus endofítico de las plantas de origen de cada cepa (E+/E-), refleja cómo las cepas de DSE pueden adoptar diversas estrategias nutricionales. Este análisis permite identificar patrones asociados a diferentes comportamientos de las cepas, ofreciendo potenciales herramientas para predecir el rol que podrían desempeñar en futuras interacciones.

Los análisis mostraron, en coincidencia con el capítulo I, una correlación positiva, aunque no significativa entre el estatus de *Epichloë* de la planta de origen y la estrategia nutricional de las cepas aisladas. Por otra parte, no se encontró una correlación entre la tasa de crecimiento y la estrategia nutricional, por lo que, no se puede adjudicar una mayor tasa de crecimiento a cepas patogénicas. En lo que

respecta al tipo de colonización tampoco se encontró una relación que asocie a *Epichloë* y las estructuras fúngicas de los DSE. Estos resultados no corroboran la hipótesis que “*Las cepas de DSE con estrategias endofíticas presentan tasas de crecimiento y patrones de colonización diferentes en comparación con las cepas patogénicas*”. De todas formas, estos resultados deben tomarse con cautela, ya que el análisis se realizó con un número de muestras bajo, dado el poco material obtenido, por lo que sería interesante repetir este análisis a partir de plantas adultas y así tener más material al momento de procesar.

En los ensayos *in vitro* con exudados de *E. platensis* sobre el crecimiento de cepas de DSE, los resultados sugieren un efecto diferencial: promoción del crecimiento en cepas endofíticas como *M. bolleyi*, *T. blackeriella* y *Herpotrichia* sp. e inhibición en cepas patógenicas como *S. terrestris* y *P. helicoides*. Este efecto varió dependiendo de las concentraciones de exudados de *E. platensis* empleadas. Estos resultados son prometedores, ya que indicarían que *Epichloë* podría actuar como promotor del crecimiento en las cepas endofíticas. Resultados similares fueron reportados en estudios previos, donde *Epichloë* promovió la micorrización y los estados pre-infectivos e infectivos de los HMA en la misma gramínea (Novas *et al.* 2011; Vignale *et al.* 2018, 2020). En este estudio, los exudados de *Epichloë* mostraron efectos diferenciales sobre las cepas de DSE, actuando como promotores o neutros en las cepas endofíticas y como inhibidores en las cepas patogénicas. Estos resultados corroboran la hipótesis sobre que “*Epichloë tiene un efecto diferencial sobre el crecimiento de las cepas DSE que es dependiente de su estrategia nutricional*”.

Los efectos de los DSE en las plantas, como ya se ha mencionado, varían desde positivos hasta negativos y las interacciones planta-hongo son dinámicas, dependiendo de la expresión génica fúngica en respuesta al hospedante, así como del reconocimiento y respuesta del hospedante frente al hongo. Un equilibrio preciso en el intercambio de nutrientes es clave para evitar que la relación se torne patogénica (Kuo *et al.*, 2014; Mengistu, 2020). En este capítulo se evaluó el efecto de una cepa patogénica de *Setophoma terrestris* en plantas adultas asociadas a *Epichloë*, y sobre los patrones de colonización. Los ensayos de patogenicidad en plantas de *B. auleticus* adultas mostraron que *S. terrestris* presentó una patogenicidad diferencial dependiendo del estado fenológico de la planta. Las

plantas adultas desarrollaron síntomas característicos en las raíces, como una coloración rosada, mientras que el follaje permaneció sin síntomas visibles. Estos resultados permiten corroborar la hipótesis de que “*Ciertas cepas de DSE con estrategia patogénica identificadas como Setophoma terrestris pueden mostrar menor virulencia a) en plantas adultas de B. auleticus que en plántulas*”.

A partir del estudio de la colonización y parámetros de crecimiento, se observó que los endofitos *Epichloë* promueven la colonización de *S. terrestris*, evidenciada por una mayor abundancia de HSO, sin afectar la biomasa del hospedante. Estos resultados permitieron corroborar la hipótesis de que “*Ciertas cepas de DSE con estrategia patogénica identificadas como Setophoma terrestris pueden mostrar menor virulencia b) en plantas adultas asociadas a Epichloë platensis en comparación con las plantas no asociadas*”. Existen antecedentes bibliográficos que abordan, los efectos de los patógenos en distintas etapas fenológicas (O’Brien *et al.*, 2021). Asimismo, estudios relacionados con los microorganismos analizados, como el de Rothen *et al.*, (2017), observaron una mayor diversidad de hongos DSE en raíces de plantas jóvenes de soja, además de una composición diferencial entre etapa vegetativa y etapa reproductiva. Por su parte, Vignale *et al.*, (2016) detectaron una mayor colonización de HMA en plantas adultas de *B. auleticus* asociadas a *Epichloë*. A futuro sería interesante, incorporar todas las cepas de *S. terrestris* que resultaron patogénicas, e inclusive las clasificadas como endofíticas y evaluar colonización y parámetros de crecimiento en distintas etapas fenológicas en un ensayo a campo.

El **capítulo III**, correspondiente al objetivo 3, evalúa el efecto simultáneo de los endofitos *Epichloë* y DSE sobre el desarrollo del hospedante, considerando el agregado de una fuente de fósforo (P). Para la realización del ensayo se utilizó la cepa de *Thelonectria blackeriella*, cepa endofítica con capacidad de solubilizar fósforo, seleccionada en el capítulo II. Este ensayo se llevó a cabo en maceta, bajo condiciones de invernadero. Además, se analizó el impacto de la asociación gramínea-*Epichloë* sobre la colonización radical por parte de los DSE. El P es un macronutriente esencial involucrado en varios procesos fisiológicos. Sin embargo, su disponibilidad en los suelos suele estar limitada por su forma insoluble. Aunque los fertilizantes sintéticos pueden optimizar su uso, también se asocia con efectos

adversos como la pérdida de fertilidad y la reducción de la densidad microbiana (Alori *et al.*, 2017).

Los resultados correspondientes a ese capítulo no evidenciaron que la asociación *Epichloë*-DSE promoviera parámetros de crecimiento en *B. auleticus*. Si bien los antecedentes han demostrado que los DSE pueden influir positiva o negativamente en el crecimiento de las plantas hospedantes, afectando especialmente la asimilación de P y nitrógeno, los resultados aquí no corroboran estos efectos. El meta-análisis de Newsham (2011) confirmó que los DSE mejoran la absorción de P cuando se combinan con fertilizantes inorgánicos. Por otro lado, estudios clave destacan su capacidad para promover el crecimiento vegetal, como se observó en *Carex* de los Alpes, donde los DSE aumentaron el peso seco y el contenido de P en brotes (Haselwandter y Read, 1982). Asimismo, se ha documentado que facilitan el acceso a fuentes de P orgánico (Surono y Narisawa, 2017, complementando a los ya mencionados HMA). En el capítulo II, se discutió la capacidad de los DSE para solubilizar P inorgánico y mineralizar P orgánico, lo cual ha sido demostrado por hongos como *Phialocephala turicensis* y *Phaeomollisia piceae*. Estos hongos, en sinergia con HMA, transfieren P a las plantas, contribuyendo a la absorción de P y aumento de la biomasa de *Trifolium repens*, tras la co-inoculación (Della Monica *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron lo esperado por lo que la hipótesis de que “*La asociación Epichloë-DSE favorece el desarrollo de B. auleticus*” no ha sido corroborada.

Finalmente al evaluar la solubilización de P por parte de *T. blackeriella* y su efecto en la absorción de este nutriente, no se observaron diferencias significativas en la concentración de P en vástago. Por lo tanto, no fue posible confirmar la hipótesis de que “*La inoculación del hongo DSE en plantas de B. auleticus facilita la solubilización de nutrientes como el fósforo y la absorción por parte de estas*”. Existen varias hipótesis que podrían explicar estos resultados. Una posibilidad es que el P solubilizado esté siendo almacenado en otros tejidos, como las raíces, en lugar de ser translocado al vástago. Otra consideración es que, aunque existen antecedentes que respaldan la capacidad de los DSE para solubilizar P, podría ser necesaria la participación de otros microorganismos, como los HMA, para facilitar la absorción y movilización del nutriente. Asimismo, sería conveniente tomar muestras en distintas etapas fenológicas de las plantas para evaluar cómo varía la absorción y distribución de nutrientes a lo largo de su ciclo de vida.

En lo que respecta al establecimiento de *T. blackeriella*, al momento de evaluar la colonización se detectó un aumento de microesclerocios en plantas E+, lo que concuerdan con resultados previos a campo (Terlizzi *et al.*, 2022), por lo tanto la hipótesis planteada de que “*Epichloë* favorece el establecimiento de la cepas DSE” si ha sido corroborada.

En conclusión, la presente Tesis permitió profundizar en el estudio de las interacciones múltiples, particularmente *Epichloë platensis-Bromus auleticus*-DSE. Se logró identificar molecularmente cepas autóctonas de DSE, algunas de las cuales mostraron capacidad para solubilizar P, lo que constituye un hallazgo prometedor. Asimismo, *Epichloë platensis* mostró un efecto modulador tanto sobre la diversidad como sobre la colonización de hongos DSE asociados a las raíces de *B. auleticus*. Las distintas estrategias nutricionales de las cepas y los efectos diferenciales según el estado fenológico de la plantas abren nuevas perspectivas para ensayos a futuro, que permitan comprender aún más las interacciones múltiples. En ese sentido, es necesario realizar más estudios para:

- Comprender los mecanismos moleculares que subyacen a las interacciones entre DSE, *B. auleticus* y *Epichloë*.
- Evaluar el efecto de la interacción *Epichloë*-DSE en diferentes condiciones ambientales y con distintas fuentes de P.
- Determinar el impacto de la colonización por DSE en la fisiología y el metabolismo de *B. auleticus*.

Este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre las interacciones multitróficas en gramíneas y su impacto en el crecimiento y desarrollo vegetal. La comprensión de estas interacciones es crucial para el desarrollo de estrategias de manejo sostenible que permitan optimizar la productividad de los cultivos.



Lic. Natalia L. Terlizzi

Dra. M. Victoria Novas

Dra. M. Alejandra Rodríguez

BIBLIOGRAFÍA

- Abaya**, A., Serajazari, M., & Hsiang, T. (2021). Control of Fusarium head blight using the endophytic fungus, *Simplicillium lamellicola*, and its effect on the growth of *Triticum aestivum*. *Biological control*, 160, 104684.
- Addy**, H. D., Piercy, M. M., Currah, R. S. (2005). Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 1-13.
- Afkhami**, M. E., Rudgers, J. A., & Stachowicz, J. J. (2014). Multiple mutualist effects: conflict and synergy in multispecies mutualisms. *Ecology*, 95(4), 833-844.
- Afkhami**, M. E., Almeida, B. K., Hernandez, D. J., Kiesewetter, K. N., & Revillini, D. P. (2020). Tripartite mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. *Current opinion in plant biology*, 56, 28-36.
- Agustí-Brisach**, C.; Gramaje, D.; León, M.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. Evaluation of vineyard weeds as potential hosts of black-foot and petri disease pathogens. *Plant Dis*. 2011, 95, 803–810.
- Alberton**, O., Kuyper, T. W., & Summerbell, R. C. (2010). Dark septate root endophytic fungi increase growth of Scots pine seedlings under elevated CO₂ through enhanced nitrogen use efficiency. *Plant and Soil*, 328, 459-470.
- Albornoz** P, Varela O y Díaz Ricci J. (2014). Micorrizas arbusculares y endofitos septados oscuros en tres especies de Rosáceas de Argentina. *Revista Agronómica del noroeste argentino*. 51(1), 9-19.
- Alderman**, S. y Rao, S. (2008). Ascosporic fertilization of *Epichloë typhina* in *Dactylis glomerata* seed production fields in Oregon and implications for choke management. *Plant Health Prog*. doi:10.1094/PHP-2008-0421-01-BR
- Alizon**, S., de Roode, J.C. & Michalakis, Y. (2013) Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters*, 16, 556–567.
- Alori**, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.
- Aly**, A. H., Debbab, A. y Proksch P. (2011) “Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 90, no. 6, pp. 1829–1845.
- An**, C., Ma, S., Shi, X., Liu, C., Ding, H., & Xue, W. (2022). Diversity and ginsenoside biotransformation potential of cultivable endophytic fungi associated with *Panax bipinnatifidus* var. *bipinnatifidus* in Qinling mountains, China. *Frontiers in pharmacology*, 13, 762862.

Anderson, I.C., Campbell, C.D., and Prosser, J.I. (2003) Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol* 5: 36–47.

Ankati, S., & Podile, A. R. (2019). Metabolites in the root exudates of groundnut change during interaction with plant growth promoting rhizobacteria in a strain-specific manner. *Journal of plant physiology*, 243, 153057.

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

Arnold, A. E., & Engelbrecht, B. M. (2007). Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology*, 23(3), 369-372.

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

Akhtar, N., Wani, A. K., Dhanjal, D. S., Mukherjee, S. (2022). Insights into the beneficial roles of dark septate endophytes in plants under challenging environment: Resilience to biotic and abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(5), 79.

Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. *J. Food Agric. Environ*, 10(3&4), 540-549.

Bacetyl, A. A., et al. Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology*, 2009, vol. 99, no 12, p. 1336-1345.

Bai, B., Liu, W., Qiu, X., Zhang, J., Zhang, J., & Bai, Y. (2022). The root microbiome: Community assembly and its contributions to plant fitness. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 230-243.

Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H., Yang, Y. (2012). The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *PLoS one*, 7(10), e47968.

Ban, Y., XU, Z., YANG, Y., ZHANG, H., CHEN, H., & TANG, M. (2017). Effect of Dark Septate Endophytic Fungus *Gaeumannomyces cylindrosporus* on Plant Growth, Photosynthesis and Pb Tolerance of Maize (*Zea mays* L.). *Pedosphere*, 27(2), 283–292. doi:10.1016/s1002-0160(17)60316-3

Barresi, O., Lavado, R.S. y Chiocchio, V.M. (2022). Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 54, Issue 3, 220-223

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

Barrow, J., y Aaltonen, R. (2001). Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 11(4), 199-205.

Barrow, J. R., y Aaltonen, R. (2004). A staining method for systemic endophytic fungi in plants. *Emerging Concepts in Plant Health Management, Research Signpost, Kerala, India*, 61-67.

Barrow, J.R. y Osuna, P. (2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments* Vol 51, Issue 3, 449-459.

Bashan, Y., Kamnev, A.A. y de-Bashan, L.E. (2013) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils* 49, 465–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7>.

Becerra, A. G., Nouhra, E. R., Silva, M. P., McKay, D. (2009). Ectomycorrhizae, arbuscular mycorrhizae, and dark-septate fungi on *Salix humboldtiana* in two riparian populations from central Argentina. *Mycoscience*, 50, 343-352.

Belesky, D.P., West, C.P. (2009). Abiotic stresses and endophyte effects. In: Fribourg, H.A., Hannaway, D.B., West, C.P. (Eds.), *Tall Fescue for the Twenty-First Century*. Agron Monogr. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 49–66.

Ben-Ami, F., Mouton, L. & Ebert, D. (2008) The effects of multiple infections on the expression and evolution of virulence in a daphnia-endoparasite system. *Evolution*, 62, 1700–1711.

Berthelot , C. , Blaudez , D. and Leyval , C. (2017). Differential growth promotion of poplar and birch inoculated with three dark septate endophytes in two trace element- contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation* , 19 , 1118 – 1125 .

Berthelot, C., Zegeye, A., Gaber, D. A., Chalot, M., Franken, P., Kovács, G. M., ... & Blaudez, D. (2020). Unravelling the role of melanin in Cd and Zn tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species. *Microorganisms*, 8(4), 537.

Berthelot, C., Blaudez, D., Beguiristain, T. et al. (2018) Co-inoculation of *Lolium perenne* with *Funneliformis mosseae* and the dark septate endophyte *Cadophora* sp. in a trace element-polluted soil. *Mycorrhiza* 28, 301–314 . <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0826-z>

Bi, Y., Wang, S., Song, Y., & Christie, P. (2024). Effects of a dark septate endophyte and extracellular metabolites on alfalfa root exudates: a non- targeted metabolomics analysis. *Physiologia Plantarum*, 176(1), e14165.

Bieleski, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1973, 24, 225–252.

Biganzoli, F., y Zuloaga, F. (2015)"Análisis de diversidad de la familia Poaceae en la región austral de América del Sur". *Rodriguésia*, 66, (2),p.337-351. [10.1590/2175-7860201566205](https://doi.org/10.1590/2175-7860201566205)

Blaney, C. S., & Kotanen, P. M. (2001). Effects of fungal pathogens on seeds of native and exotic plants: A test using congeneric pairs. *Journal of Applied Ecology*, 38, 1104–1113.

Bonkowski, M., Villenave, C., & Griffiths, B. (2009). Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots.

Bruton, B. D., & Miller, M. E. (1997). Occurrence of vine decline diseases of melons in Honduras. *Plant Disease*, 81(6), 696-696.

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaepi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., and Schulze-Lefert, P. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91-95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>

Bustamante E, Ruiz M, Morici E, Babinec FJ y Pordomingo AB (2012). Biomasa acumulada e indicadores de calidad nutritiva en cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus Trinius ex Nees*). RIA Revista de investigaciones agropecuarias 38:251-256

Butler, M. J., Day, A. W. (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian journal of microbiology*, 44(12), 1115-1136.

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

Cade-Menun, B.J.; Carter, M.R.; James, D.C.; Liu, C.W. Phosphorus forms and chemistry in the soil profile under long-term conservation tillage: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study. *J. Environ. Qual.* 2010, 39, 1647–1656.

Caldwell, B. A., Jumpponen, A., Trappe, J. M. (2000). Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. *Mycologia*, 92(2), 230-232.

Campbell K. W. et al. Plant Dis. 75:1186, 1991. (2) D. G. White, ed. *Compendium of Corn Diseases*. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, 1999.

Cano C, Bago A (2005) Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 97:1201–14.

Cardozo, G.A., Ayala, W., Lezama, F. et al. Limited response to phosphorus fertilization in native South American grasslands across a productivity gradient despite low phosphorus concentrations in grassland herbage. *Plant Soil* 502, 497–513 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11104-024-06562-5>

Carvalho, F.P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy*, 9, 685–692.

Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M. R., Borriss, R., & von Wirén, N. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 3-11.

Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., El Meniy, N., Benali, T., & Ghoulam, C. (2022). Is—the rhizosphere a source of applicable multi-beneficial microorganisms for plant enhancement?. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1246-1259.

Choisy, M. & de Roode, J.C. (2010) Mixed infections and the evolution of virulence: effects of resource competition, parasite plasticity, and impaired host immunity. *The American Naturalist*, 175, E105–E118.

Christensen, M. J., Bennett, R. J., Ansari, H. A., Koga, H., Johnson, R. D., Bryan, G. T., ... & Voisey, C. R. (2008). Epichloë endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. *Fungal Genetics and Biology*, 45(2), 84-93.

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

Cisneros G., Rothen C., Lo T., Ghezzo D., Fernandez di Pardo A., Fracchia S., Godeas A., Rodríguez M. A. Diversidad y tolerancia a la salinidad de hongos endofitos presentes en raíces de *Puccinellia frigida*, especie endémica de Laguna Brava, La Rioja. XIII Congreso Argentino de Micología y de la 1ra Reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini. 24 al 27 de agosto de 2014. Buenos Aires. Argentina.

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

Clay, K., y Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *the american naturalist*, 160(S4), S99-S127.

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

Collinge, D. B., Jensen, B., & Jørgensen, H. J. (2022). Fungal endophytes in plants and their relationship to plant disease. *Current Opinion in Microbiology*, 69, 102177.

Constantin ME, Fokkens L, de Sain M, Takken FLW, Rep M(2021): Number of candidate effector genes in accessory genomes differentiates pathogenic from endophytic *Fusarium oxysporum* strains. *Front Plant Sci* , 12:761740, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.761740>.

Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Shivas, R. G., Edwards, J., Seifert, K. A., Alfenas, A. C., ... Quaedvlieg, W. (2011). Fungal Planet description sheets: 69–91. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26(1), 108–156. doi:10.3767/003158511x581723

Cuassolo, F., Diaz- Villanueva, V. (2023). Arbuscular mycorrhizal and dark septate fungi colonization in an invasive plant from Patagonian wetlands. *Austral Ecology*, 48(8), 2013-2029

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

Czarnota, M. A., Rimando, A. M., & Weston, L. A. (2003). Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of chemical ecology*, 29, 2073-2083.

Dalai, R.C. Soil organic phosphorus. *Adv. Agron.* 1977, 29, 83–117.

Dastogeer, K. M., & Wylie, S. J. (2017). Plant–fungi association: role of fungal endophytes in improving plant tolerance to water stress. *Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives: volume 1: fundamental mechanisms, methods and functions*, 143-159.

Della Mónica, I. F., Stefanoni Rubio, P. J., Cina, R. P., Recchi, M., Godeas, A. M., & Scervino, J. M. (2014). Effects of the phosphate-solubilizing fungus *Talaromyces flavus* on the development and efficiency of the *Gigaspora rosea*-*Triticum aestivum* symbiosis. *Symbiosis*, 64, 25-32.

Della Mónica, I. F., Saparrat, M. C., Godeas, A. M., & Scervino, J. M. (2015). The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecology*, 17, 10-17.

Deng, X., Song, X., Halifu, S., Yu, W., & Song, R. (2020). Effects of dark septate endophytes strain A024 on damping-off biocontrol, plant growth and the rhizosphere soil environment of *Pinus sylvestris* var. mongolica annual seedlings. *Plants*, 9(7), 913.

Denison, R. F., & Kiers, E. T. (2011). Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*, 21(18), R775-R785.

De Roode, J.C., Yates, A.J. & Altizer, S. (2008) Virulence-transmission trade-offs and population divergence in virulence in a naturally occurring butterfly parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7489–7494.

Dessaix, Y., Grandclément, C., & Faure, D. (2016). Engineering the rhizosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 266-278.

Dhillon, J.; Torres, G.; Driver, E.; Figueiredo, B.; Raun, W.R. World phosphorus use efficiency in cereal crops. *Agron. J.* 2017, 109, 1670–1677

D'Jonsiles, M. F., Carmarán, C. C., Robles, C. A., Ceriani-Nakamurakare, E. D., & Novas, M. V. (2019). Mycorrhizal colonization and soil parameters affected by foliar endophytes in *Jatropha curcas* L. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19, 332-341.

Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (1980). *Compendium of soil fungi. Volume 1*.

Dor, S., & Degani, O. (2019). Uncovering the host range for maize pathogen *Magnaportheopsis maydis*. *Plants*, 8(8), 259.

Echeverria, M., Izzi, Y. S., Criado, M. V., & Caputo, C. (2024). Isolation and characterization of dematiaceous endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their potential use as phosphate solubilizers. *The Microbe*, 3, 100058.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycetes. *Commonwealth Mycological Institute*, 608.

El-Metwally, M. M., Mekawey, A. A. I., El-Halmouch, Y., & Naga, N. G. (2023). Symbiotic relationships with fungi: From Mutualism to parasitism. In *Plant mycobiome: diversity, interactions and uses* (pp. 375-413). Cham: Springer International Publishing.

Elser, J., y Bennett, E. (2011). A broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478(7367), 29-31.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.

Fernando AA, Currah RS. 1996. A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Canadian Journal of Botany* 74: 1071–1078.

Fernández N, Messuti M y Fontenla S (2008). Arbuscular Mycorrhizas and Dark Septate Fungi in *Lycopodium paniculatum* (Lycopodiaceae) and *Equisetum bogotense* (Equisetaceae) in a Valdivian Temperate Forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal*, 98(3), 117-127. [http://doi.org/10.1640/0002-8444\(2008\)98\[117:AMASF\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1640/0002-8444(2008)98[117:AMASF]2.0.CO;2)

Fernández N, Fontenla S y Messuti M (2010). Mycorrhizal Status of Obligate and Facultative Epiphytic Ferns in a Valdivian Temperate Forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal*, 100(1), 16-26. <http://doi.org/10.1640/0002-8444-100.1.16>

Fernández, N., Fontenla, S., & Messuti, M. I. (2011). Co-occurrence of arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in pteridophytes from a Valdivian Temperate Rainforest in Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored Environments*; Pagano, M., Ed, 99-126.

Fors, R. O., Patreze, C. M., Louro Berbara, R. L., Carbone Carneiro, M. A., & Saggin-Júnior, O. J. (2020). Dark septate endophytic fungi associated with sugarcane plants cultivated in São Paulo, Brazil. *Diversity*, 12(9), 351.

Fontenla, S. B., Fernández, N. V., Mestre, M. C., & Puntieri, J. P. (2022). Current knowledge on mycorrhizal symbiosis and endophytes in northwest Patagonia, Argentina. *Mycorrhizal Fungi in South America: Biodiversity, Conservation, and Sustainable Food Production*, 255-279.

Fracchia S, Aranda A, Gopar A, Silvani V, Fernandez L y Godeas A (2009). Mycorrhizal status of plant species in the Chaco Serrano Woodland from central Argentina. *Mycorrhiza*, 19(3), 205-214. <http://doi.org/10.1007/s00572-009-0231-8>

Francis, R. M., y Read, D. J. (1995). Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1301-1309.

Frank, S.A. 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* 71:37–78.

Frederick BA, Caesar-TonThat TC, Wheeler MH, Sheehan KB, Edens WA, Henson JM. 1999. Isolation and characterization of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* mutants. *Mycol Res* 103: 99–110.

Fryar SC, Booth W, Davies J, et al (2005) Evidence of in situ competition between fungi in freshwater. *Fungal Divers* 59–71

Fujii, K.; Hayakawa, C. Sukartiningsih Root Exudation and Biodegradation of Organic Acids in a Tropical Forest Soil under Dipterocarp and Pioneer Trees. *Plant Soil* 2021, 469, 213–226.

Gaber, D. A., Berthelot, C., Camehl, I., Kovács, G. M., Blaudez, D., & Franken, P. (2020). Salt stress tolerance of dark septate endophytes is independent of melanin accumulation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 562931.

Gaber DA, Berthelot C, Blaudez D, Kovács GM and Franken P (2023) Impact of dark septate endophytes on salt stress alleviation of tomato plants. *Front. Microbiol.* 14:1124879. doi: 10.3389/fmicb.2023.1124879

Gallagher, R.T., White, E.P., and Mortimer, P.H. 1981. Ryegrass staggers: Isolation of potent neurotoxins lolitrem A and lolitrem B from staggers producing pastures. *N.Z. Vet. J.* 29:189–190.

Gallaud, I. (1905). Etudes sur les Mycorhizes endotrophes, *Rev. Gen. Bot.* 17, 1-48.

Galvagno, M. A. (1976). Ensayos de nutricion en *Ascobolus crenulatus* P. Karst.(Fungi: Ascomycetes). *Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica*, 17.

Gams W (2000) Phialophora and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. In: *Studies in mycology*, pp 187–200

Garces, K. R., Sage, H. E., Christian, N., & Emery, S. M. (2022). *Epichloë* increases root fungal endophyte richness and alters root fungal endophyte composition in a changing world. *Journal of Fungi*, 8(11), 1142.

Garcia, K.; Delaux, P.-M.; Cope, K.R.; Ané, J.-M. (2015). Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytol.*, 208, 79–87.

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

George, T.S.; Hinsinger, P.; Turner, B.L. (2006). Phosphorus in soils and plants-facing phosphorus scarcity. *Plant Soil* 2016, 401, 1–6.

Gessler, N. N., Egorova, A. S., & Belozerskaya, T. A. (2014). Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 105-113.

Giehl, R.F.H.; von Wieren, N. Root nutrient foraging. *Plant Physiol.* 2014, 166, 509–517.

Gilbert, G. S. (2002). Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 13–43.

Gonçalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F., & Pombeiro-Sponchiado, S. R. (2012). Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1467-1474.

Goodarzian, K., Tajick Ghanbary, M. A., Babaeizad, V., & Mojerlou, S. (2021). Identification of root endophytic fungi from rangeland plants in Mazandaran province. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research*, 18(2), 216-232.

Górzyńska, K., Ryszka, P., Anielska, T., Turnau, K., & Lembicz, M. (2017). Effect of Epichloë typhina fungal endophyte on the diversity and incidence of other fungi in *Puccinellia distans* wild grass seeds. *Flora*, 228, 60-64.

Gramaje, D., Berlanas, C., Martinez-Diz, M. D. P., Diaz-Losada, E., Antonielli, L., Beier, S., ... & Compant, S. (2020). Comparative genomic analysis of *Dactylolectria torresensis* strains from grapevine, soil and weed highlights potential mechanisms in pathogenicity and endophytic lifestyle. *Journal of Fungi*, 6(4), 255.

Gower, C.M. & Webster, J.P. (2005) Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution*, 59, 544–553.

Grünig, C. R., Sieber, T. N., Rogers, S. O., & Holdenrieder, O. (2002). Spatial distribution of dark septate endophytes in a confined forest plot. *Mycological Research*, 106(7), 832-840.

Grünig, C. R., Queloz, V., Sieber, T. N., & Holdenrieder, O. (2008). Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l–*Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany*, 86(12), 1355-1369.

Grünig, C. R., Queloz, V., Sieber, T. N. (2011). Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. *Endophytes of forest trees: biology and applications*, 3-30.

Gruyter J y Boerema GH. 2002. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VIII. Section Paraphoma: Taxa with setose pycnidia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 17(4) 541–561. <https://repository.naturalis.nl/pub/532020>

Guan, Y. M., Ma, Y. Y., Jin, Q., Wang, Q. X., Liu, N., Fu, Y. P., ... & Li, Y. (2020). Multi-locus phylogeny and taxonomy of the fungal complex associated with rusty root rot of *Panax ginseng* in China. *Frontiers in Microbiology*, 11, 618942.

Gundel, P.E., Iannone, L., Perez, L.I., y Irisarri, J.G.N. (2010). Variación poblacional del pasto perenne *Hordeum comosum* como anfitrión de endofitos *Neotyphodium* en estepas patagónicas. In: IV Reunión Binacional de Ecología, XXIV Reunión Argentina de Ecología

Gundel, P.E., Garibaldi, L.A., Martínez-Ghersa, M.A., Ghersa, C.M., 2011. *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. *Environ. Exp. Bot.* 71, 359–366.

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

Guo, J., Mcculley, R.L., Mcnear Jr., D.H., (2015). Tall fescue cultivar and fungal endophyte combinations influence plant growth and root exudate composition. *Front. Plant Sci.* 6, 183.

Guo, J., McCulley, R. L., Phillips, T. D., & McNear Jr, D. H. (2016). Fungal endophyte and tall fescue cultivar interact to differentially affect bulk and rhizosphere soil processes governing C and N cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 101, 165-174.

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

Ha, S.; Tran, L.-S. (2014) .Understanding plant responses to phosphorus starvation for improvement of plant tolerance to phosphorus deficiency by biotechnological approaches. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 34, 16–30.

Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P. C., Garrido-Oter, R., Thon, M. R., ... & O'connell, R. J. (2016). Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nature communications*, 7(1), 11362.

Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., and Ausubel, F. M. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat. Plants* 1:15051. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>

Haroim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M.,\ y Sessitsch, A. I. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 79(3):293-320. doi: 10.1128/MMBR.00050-14

Hartmann, A., Rothbäller, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil*, 312, 7-14.

Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. V., & Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes.

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

Hashiba, T., & Narisawa, K. (2005). The development and endophytic nature of the fungus *Heteroconium chaetospira*. *FEMS microbiology letters*, 252(2), 191-196.

Haynes, R. J. (1982). Effects of liming on phosphate availability in acid soils: a critical review. *Plant and soil*, 68, 289-308.

He C, Wang W, Hou J (2020) Plant performance of enhancing licorice with dual inoculating dark septate endophytes and *Trichoderma viride* mediated via effects on root development. *BMC Plant Biol* 20:325

He C, Wang W, Hou J (2019) Characterization of Dark Septate Endophytic Fungi and Improve the Performance of Liquorice Under Organic Residue Treatment. *Front Microbiol* 10:1364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01364>

Henry, A., Doucette, W., Norton, J., & Bugbee, B. (2007). Changes in crested wheatgrass root exudation caused by flood, drought, and nutrient stress. *Journal of environmental quality*, 36(3), 904-912.

Hinsinger, P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant Soil*, 237, 173–195

Hoeksema, J. D. (2010). Ongoing coevolution in mycorrhizal interactions. *New Phytologist*, 187(2), 286-300.

Hoffman, G.D., y S. Rao. 2014. Fertilization of *Epichloë typhina* stromata by mycophagous slugs. *Mycologia* 106:1-7.

Hoog, G. D., & Hermanides-Nijhof, E. J. (1977). The black yeasts and allied Hyphomycetes.

Hu, L., Robert, C. A., Cadot, S., Zhang, X. I., Ye, M., Li, B., ... & Erb, M. (2018). Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature communications*, 9(1), 2738.

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

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

Iannone, L.J., White Jr, J.F., Giussani, L.M., Cabral, D. y Novas, M.V. (2011). Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycol Prog* 10:9-19

Iannone, L.J., Novas, M.V., Young, C.A., De Battista, J.P. y Schardl, C.L. (2012). Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. *Fungal Ecol* 5:357-363.

Iannone, L. J., Vignale, M. V., Pinget, A. D., Re, A., Mc Cargo, P. D., y Novas, M. V. (2017). Seed-transmitted *Epichloë* sp. endophyte alleviates the negative effects of head smut of grasses (*Ustilago bullata*) on *Bromus auleticus*. *Fungal ecology*, 29, 45-51.

Iannone, L. J., Novas, M. V., Mc Cargo, P. D., Ueno, A. C., & Gundel, P. E. (2021). Diversity, Ecology, and Applications of Epichloë Fungal Endophytes of Grasses in South America. In *Neotropical Endophytic Fungi: Diversity, Ecology, and Biotechnological Applications* (pp. 11-36). Cham: Springer International Publishing.

Ikeda, K., Kuwabara, K., Urushibara, T., Soyai, P., Miki, S., & Shibata, S. (2012). Pink root rot of squash caused by *Setophoma terrestris* in Japan. *Journal of general plant pathology*, 78(5), 372-375.

Jain, A.; Poling, M.D.; Karthikeyan, A.S.; Blakeslee, J.J.; Peer, W.A.; Titapiwatanakun, B.; Murphy, A.S.; Raghothama, K.G. (2007). Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 144, 232–247.

Johnson, N. C., Graham, J. H., & Smith, F. A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *The New Phytologist*, 135(4), 575-585.

Jones MD, Durall DM, Tinker DM (1990) Phosphorus relationships and production of extramatrical hyphae by 2 types of willow ectomycorrhizas at different soil-phosphorous levels. *New Phytol* 15:259–267. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00451.x

Jones, M. D., y Smith, S. E. (2004). Exploring functional definitions of mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualisms?. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1089-1109.

Jones, S. L., & French, K. (2021). Soil nutrients differentially influence root colonisation patterns of AMF and DSE in Australian plant species. *Symbiosis*, 83(2), 209-223.

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

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

Junker, C., Draeger, S., & Schulz, B. (2012). A fine line–endophytes or pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology*, 5(6), 657-662.

Kanse, O. S., Whitelaw-Weckert, M., Kadam, T. A., & Bhosale, H. J. (2015). Phosphate solubilization by stress-tolerant soil fungus *Talaromyces funiculosus* SLS8 isolated from the Neem rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 65, 85-93.

Kariman, K., Barker, S. J., & Tibbett, M. (2018). Structural plasticity in root-fungal symbioses: diverse interactions lead to improved plant fitness. *PeerJ*, 6, e6030.

Karst, J., Jones, M. D., & Turkington, R. (2009). Ectomycorrhizal colonization and intraspecific variation in growth responses of lodgepole pine. *Plant Ecology*, 200, 161-165.

Karlsson, I., Persson, P., & Friberg, H. (2021). *Fusarium* head blight from a microbiome perspective. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628373.

Katznelson, H., Peterson, E., Rouatt, J. (1962). Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Canadian Journal of Botany* 40(9): 1181-1186.

Kerr, B., Neuhauser, C., Bohannan, B.J. & Dean, A.M. (2006) Local migration promotes competitive restraint in a host-pathogen 'tragedy of the commons'. *Nature*, 442, 75–78.

Kia, S. H., Glynou, K., Nau, T., Thines, M., Piepenbring, M., Maciá-Vicente, J. G. (2017). Influence of phylogenetic conservatism and trait convergence on the interactions between fungal root endophytes and plants. *The ISME journal*, 11(3), 777-790.

King, K.W.; Williams, M.R.; Macrae, M.L.; Fausey, N.R.; Frankenberger, J.; Smith, D.R.; Kleinman, P.J.A.; Brown, L.C. Phosphorus transport in agricultural subsurface drainage: A review. *J. Environ. Qual.* 2015, 44, 467–485.

Kivlin, S.N., Emery, S.M., Rudgers, J.A., 2013. Fungal symbionts alter plant responses to global change. *Am. J. Bot.* 100, 1445e1457. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200558>.

Khan, M. S. I., Roy, S. S., & Pall, K. K. (2010). Nitrogen and phosphorus efficiency on the growth and yield attributes of capsicum. *Academic journal of plant Sciences*, 3(2), 71-78.

Khorassani, R., Hettwer, U., Ratzinger, A., Steingrobe, B., Karlovsky, P., & Claassen, N. (2011). Citramalic acid and salicylic acid in sugar beet root exudates solubilize soil phosphorus. *BMC Plant Biology*, 11, 1-8.

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

Knapp, D. G., Kovács, G. M., Zajta, E., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 87-100.

Knapp, D. G., Németh, J. B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J., ... & Kovács, G. M. (2018). Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific reports*, 8(1), 6321.

Koenning, S. R., Frye, J. W., Pataky, J. K., Gibbs, M., & Cotton, D. (2007). First report of *Phoma terrestris* causing red root rot on sweet corn (*Zea mays*) in North Carolina. *Plant Disease*, 91(8), 1054-1054.

Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., ... & Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature genetics*, 47(4), 410-415.

Kowalski, T., y Andruch, K. (2012). Mycobiota in needles of *Abies alba* with and without symptoms of *Herpotrichia* needle browning. *Forest Pathology*, 42(3), 183-190.

Krings, Michael y Taylor, Thomas & Hass, Hagen & Kerp, Hans & Dotzler, Nora & Hermsen, Elizabeth. (2007). Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ.. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol* 174: 648-657. *The New phytologist*. 174. 648-57. 10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x.

Kruse, J.; Abraham, M.; Amelung, W.; Baum, C.; Bol, R.; Kühn, O.; Lewandowski, H.; Niederberger, J.; Oelmann, Y.; Rüger, C.; et al. Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 2015, 178, 43–88.

Kucey, R. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63(4), 671-678.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Kumar, V., Soni, R., Jain, L., Dash, B., Goel, R. (2019). Endophytic fungi: recent advances in identification and explorations. *Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges*, 267-281.

Kulda, Gretchen & CW, Bacon. (2008). Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*. 46. 57-71. 10.1016/j.biocontrol.2008.01.023.

Kuo H. C., Hui, S., Choi, J., Asiegbu, F. O., Valkonen, J. P. T., y Lee, Y. (2014) Secret lifestyles of *Neurospora crassa*, *Scientific Reports*, vol. 4, 2014.

Lacap, D.C., Hyde, K.D. y Liew, E.C.Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12, 53-66.

Langenhoven, S.D.; Halleen, F.; Spies, C.F.J.; Stempien, E.; Mostert, L. Detection and quantification of black foot and Crown and root rot pathogens in grapevine nursery soils in the Western Cape of South Africa. *Phytopathol. Mediterr.* 2018, 57, 519–537

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

Larimer, A. L., Bever, J. D., & Clay, K. (2012). Consequences of simultaneous interactions of fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi with a shared host grass. *Oikos*, 121(12), 2090-2096.

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.

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

Leuchtmann, A.; Bacon, C.W.; Schardl, C.L.; White J.F.; Tadych, M. (2014). Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycol. 106*: 202-215.

Levy, Y. & Cohen, Y. 1983a. Differential effect of light on spore germination of *Exserohilum turcicum* on corn leaves and corn leaf impressions. *Phytopathology* 73: 249–252.

Levy, Y. & Cohen, Y. 1983b. Biotic and environmental factors affecting infection of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology* 73: 722–725.

Li, C.J., Nan, Z.B., Paul, V.H., Daprich, P.D. y Liu, Y .(2004). A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China. *Mycotaxon* 90: 141-147.

Li, X., He, X., Hou, L. et al. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Sci Rep* 8, 7896 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26183-0>

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*, 439, 259-272.

Li, X., Li, D., Yan, J., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, J., ... & Li, B. (2021). Effect of plant-growth-promoting fungi on eggplant (*Solanum melongena* L.) in new reclamation land. *Agriculture*, 11(11), 1036.

Li, W., Yao, J., He, C., Ren, Y., Zhao, L., He, X. (2023). The synergy of dark septate endophytes and organic residue on *Isatis indigotica* growth and active ingredients accumulation under drought stress. *Industrial Crops and Products*, 203, 117147.

Likar , M. and Regvar , M. (2009). Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil . The Science of the Total Environment , 407 , 6179 – 6187 .

Lindsay, R.J., Jepson, A., Butt, L., Holder, P.J., Smug, B.J. & Gudelj, I. (2021) Would that it were so simple: interactions between multiple traits undermine classical single-trait-based predictions of microbial community function and evolution. *Ecology Letters*, 24, 2775–2795.

Lindsay, R. J., Holder, P. J., Talbot, N. J., & Gudelj, I. (2023). Metabolic efficiency reshapes the seminal relationship between pathogen growth rate and virulence. *Ecology Letters*, 26(6), 896-907.

Little, T., Chadwick, W. & Watt, K. (2008) Parasite variation and the evolution of virulence in a daphnia-microparasite system. *Parasitology*, 135, 303–308.

Lizarraga SV, Ruiz AI, Salazar SM y Albornoz PL (2015). Micorrizas vesículo-arbusculares, endofitos septados oscuros y anatomía radical en *Fragaria ananassa* var. Camino Real (Rosaceae), en la provincia de Tucumán, Argentina. *Revista Agronómica del noroeste argentino*, 35, 11-17.

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

Liu, J., Nagabhyru, P., y Schardl, C.L. (2017). *Epichloë festucae* endophytic growth in florets, seeds, and seedlings of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycologia*, 109: 691-700.

Liu F, Wang J, Li H, Wang W and Cai L. 2019. *Setophoma* spp. on *Camellia sinensis*. *Fungal Systematics and Evolution* 4: 43–57. <https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.05>

Liu, Y., & Wei, X. (2019). Dark septate endophyte improves drought tolerance of *Ormosia hosiei* Hemsley & EH Wilson by modulating root morphology, ultrastructure, and the ratio of root hormones. *Forests*, 10(10), 830.

Lizarraga, S. V., Perez, G. A., Ruiz, A. I., Salazar, S. M., Diaz Ricci, J. C., & Albornoz, P. L. (2018). Rendimiento frutal de tres variedades de *Fragaria ananassa* en relación con el grado de colonización por micorrizas arbusculares y otros endófitos fúngicos, Tucumán, Argentina. Respuesta histológica radical a la interacción. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 38(2), 145-154.

Lee C, Kim S, Li W et al (2017) Bioactive secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Gaeumannomyces* sp. JS0464 from a maritime halophyte *Phragmites communis*. *J Antibiot (Tokyo)* 70:737–742.

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

Lofgren, L. A., LeBlanc, N. R., Certano, A. K., Nachtigall, J., LaBine, K. M., Riddle, J., ... & Kistler, H. C. (2018). *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses?. *New Phytologist*, 217(3), 1203-1212.

Lopez, R. O., Chiocchio, V. M., Ruscitti, M. F., Taborda, C. P., & Saparrat, M. C. N. (2024). Towards a better understanding of melanins from dark septate endophytes (DSEs): Their variability, synthesis pathways and biological roles. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-15.

López-López AM, TovarPedraza JM, León-Félix J, Allende-Molar R, Bernardi LN, Márquez-Zequera I y García-Estrada RS. 2024. Caracterización morfológica, filogenia y patogenicidad de *Setophoma terrestris* causante de raíz corchosa y rosada de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 42(2): 12. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2309-5>

Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L., y Elrod, S.L. (2002) Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 327–337.

Luo, J., Vines, P. L., Grimshaw, A., Hoffman, L., Walsh, E., Bonos, S. A., ... & Zhang, N. (2017). *Magnaportheopsis meyeri-festucae*, sp. nov., associated with a summer patch-like disease of fine fescue turfgrasses. *Mycologia*, 109(5), 780-789.

Luo, Q., Hou, R., Shang, X., & Li, S. (2023). Effects of Phosphorus-dissolving Dark Septate Endophytes on the Growth of Blueberry. *Journal of Microbiology*, 61(9), 837-851.

Lukešová T, Kohout P, Větrovský T, Vohník M. 2015. The potential of dark septate endophytes to form root symbioses with ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal middle European forest plants. *PLoS ONE* 2015;10(4):e0124752.

Lugo, M. A., Molina, M. G., Crespo, E. M. (2009). Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in bromeliads from South American arid environment. *Symbiosis*, 47, 17-21.

Lugo, M. A., Giordano, P. G., Urcelay, C., & Crespo, E. M. (2011). Colonización radical por endófitos fúngicos en *Trithrinax campestris* (Arecaceae) de ecosistemas semiáridos del centro de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 46(3-4), 213-222.

Lugo, M. A., Menoyo, E., Allione, L. R., Negritto, M. A., Henning, J. A., Anton, A. M. (2018). Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes associated with grasses from the Argentine Puna. *Mycologia*, 110(4), 654-665.

MacDonald, G. K., Bennett, E. M., Potter, P. A., & Ramankutty, N. (2011). Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3086-3091.

Maciá-Vicente, J. G., Glynou, K., & Piepenbring, M. (2016). A new species of *Exophiala* associated with roots. *Mycological Progress*, 15(2). doi:10.1007/s11557-016-1161-4

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

McGranahan, D. A., Burgdorf, R., & Kirkman, K. P. (2015). *Epichloë* infection in a native South African grass, *Festuca costata* N ees. *Plant Biology*, 17(4), 914-921.

Mahmoud, R. S., & Narisawa, K. (2013). A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions. *PLoS One*, 8(11), e78746.

Malicka, M., Magurno, F., Piotrowska-Seget, Z. (2022). Plant association with dark septate endophytes: When the going gets tough (and stressful), the tough fungi get going. *Chemosphere*, 302, 134830.

Malinowski, D. P., y Belesky, D. P. (2000). Adaptations of endophyte- infected cool- season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40(4), 923-940.

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

Manici, L. M., Kelderer, M., Caputo, F., Saccà, M. L., Nicoletti, F., Topp, A. R., & Mazzola, M. (2018). Involvement of *Dactylonectria* and *Ilyonectria* spp. in tree decline affecting multi-generation apple orchards. *Plant and Soil*, 425, 217-230.

Mandyam, K., y Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in mycology*, 53(1), 173-189.

Mandyam, K., Loughin, T., & Jumpponen, A. (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4), 813–821. doi:10.3852/09-212

Mandyam, K., Fox, C., & Jumpponen, A. (2012). Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza*, 22, 109-119.

Mandyam, K. G., Roe, J., y Jumpponen, A. (2013). *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biology*, 117(4), 250-260.

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

Marschner, P. (2012). Rhizosphere biology. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (pp. 369-388). Academic Press.

Mayerhofer, M. S., Kernaghan, G., & Harper, K. A. (2013). The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 23, 119-128.

Mc Cargo, P. D., Iannone, L. J., Vignale, M. V., Schardl, C. L., y Rossi, M. S. (2014). Species diversity of *Epichloë* symbiotic with two grasses from southern Argentinean Patagonia. *Mycologia*, 106(2), 339-352.

Mc Cargo PD, Iannone LJ, Soria M, Novas MV. (2020). Diversity of foliar endophytes in a dioecious wild grass and their interaction with the systemic Epichloë. *Fungal Ecology* <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100945>

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

Melin, E. (1922). On the mycorrhizas of *Pinus silvestris* L. and *Picea abies* Karst: a preliminary note. *Journal of Ecology*, 9(2), 254-257.

Melin, E. (1923). Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus silvestris* und *Picea abies*. *Mykol Untersch Ber von R Falck*, 2, 73-330.

Mengistu, A. A. (2020). Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 6927219.

Menoyo E, Becerra AG y Renison D (2007). Mycorrhizal associations in Polylepis woodlands of Central Argentina. *Canadian Journal of Botany*, 85(5), 526-531. <http://doi.org/10.1139/B07-042>

Menoyo, E., Teste, F. P., Ferrero, M. A., Lugo, M. A. (2020). Associations between fungal root endophytes and grass dominance in arid highlands. *Fungal Ecology*, 45, 100924.

Mercado, M. I., Coll Aráoz, M. V., Brandán De Weht, C. I., Ponessa, G. I., Grau, A. (2013). Arbuscular mycorrhizal associations and dark septate endophytes in Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and a wild relative (*Smallanthus macroscyphus*). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48(2), 0-0.

Mesny, F., Miyauchi, S., Thiergart, T., Pickel, B., Atanasova, L., Karlsson, M., ... & Hacquard, S. (2021). Genetic determinants of endophytism in the *Arabidopsis* root mycobiome. *Nature communications*, 12(1), 7227.

Meyer, S.E., Stewart, T.E. & Clement, S. (2010) The quick and the deadly: growth vs virulence in a seed bank pathogen. *New Phytologist*, 187, 209–216.

Micallef, S. A., Shiaris, M. P., & Colón-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of experimental botany*, 60(6), 1729-1742.

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

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

Minghui, X. U., Xia, L. I., Qiannan, Y. E., Feng, G. O. N. G., & Xueli, H. E. (2024). Occurrence of dark septate endophytes in *Phragmites australis* in the Baiyang Lake and their resistance to Cd stress. *Pedosphere*, 34(2), 484-496.

Miranda, V., Scervino, J. M., Barros, J., Rodríguez, M. A., & Fracchia, S. (2020). Physiological characterisation of coprophilous fungal isolates that behave as plant root associates. *Soil Research*, 58(8), 748-758.

Moraes C y Oliveira J (1990). Avaliação agronômica preliminar de genótipos de *Bromus aule ticus* Trinius. EMBRAPA-CNP

Mukerji, K. G. (2002). Rhizosphere biology. In *Techniques in Mycorrhizal studies* (pp. 87-101). Dordrecht: Springer Netherlands.

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

Munkvold, L., Kjøller, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., & Jakobsen, I. (2004). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 164(2), 357-364.

Nardi, S.; Concheri, G.; Pizzeghello, D.; Sturaro, A.; Rella, R.; Parvoli, G. (200). Soil Organic Matter Mobilization by Root Exudates. *Chemosphere* 41, 653–658.

Navarro L (2008). Selección de hospedantes de la cepa DSE1 (Dark Septate Endophyte) y efecto sobre el crecimiento de las plantas infectadas [Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas]. Argentina: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170(1): 265-270.

Nei M. and **Kumar** S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Newsham KK (1999). *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. *New Phytologist*, 144(3), 517-524. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00537.x>

Newsham, K.K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190(3), 783-793. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03611.x>

Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2).

Novas, M.V., Gentile, A., Cabral, D. (2003) Comparative study of growth parameters on diaspores and seedlings between populations of *Bromus setifolius* from Patagonia, differing in

Neotyphodium endophyte infection. Flora- Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 198:421- 426

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

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

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

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

Núñez, R. A. V., García, J. C. R., Bedmar E. J. (2022). Dark septate endophytes: a review. Sociedad de Ciencias de Galicia 22, 1; 1-13.

O'Brien, A. M., Ginnan, N. A., Rebolleda- Gómez, M., & Wagner, M. R. (2021). Microbial effects on plant phenology and fitness. *American journal of botany*, 108(10), 1824-1837.

Oburger, E.; Jones, D.L. Sampling Root Exudates—Mission Impossible? Rhizosphere 2018, 6, 116–133.

O'Dell TE, Massicotte HB, Trappe JM (1993) Root colonisation of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. New Phytol 124: 93–100

Ohki, T., Yonezawa, M., Hashiba, T., Masuya, H., Usuki, F., & Narisawa, K. (2002). Colonization process of the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* in roots of Chinese cabbage. *Mycoscience*, 43(2), 191-194.

Olanrewaju, O. S., Ayangbenro, A. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2019). Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. Applied microbiology and biotechnology, 103, 1155-1166.

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

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

Omar SA. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14: 211–218.

- Osuna-Avila, P., & Barrow, J. (2009).** In vitro system to determine the role of *Aspergillus ustus* on *Daucus carota* roots. *Terra Latinoamericana*, 27(4), 363-372.
- Park, S. U., Lim, H. S., Park, K. C., Park, Y. H., & Bae, H. (2012).** Fungal endophytes from three cultivars of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. *Journal of ginseng research*, 36(1), 107.
- Panaccione, D. G. (2005).** Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *FEMS Microbiology letters*, 251(1), 9-17.
- Pereira E, Coelho V, Tavares RM, et al (2012)** Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance. *Mycorrhiza* 22:41–9.
- Pescie, M. A., Fradkin, M., Lavado, R. S., & Chiocchio, V. M. (2021).** Endophytic fungi in blueberry cultivars, in three production areas of Argentina. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101662.
- Peterson RL, Wagg C y Paultler M (2008).** Associations between microfungal endophytes and roots: do structural features indicate function? *Canadian journal of Botany*, 86: 445-456.
- Petrini, O. (1991).** Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Peyronel, B. (1924).** *Prime ricerche sulle micorize endotrofiche e sulla micoflora radicicola normale delle fanerogame*. Tipografia del Senato.
- Phillips JM y Hayman DS (1970).** Improved procedures for clearing roots and staining para sitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *T Brit Mycol Soc* 55:158-161
- Phookamsak, R., Manamgoda, D. S., Li, W. J., Dai, D. Q., Singtripop, C., & Hyde, K. D. (2015).** Poaceascoma helicoides gen et sp. nov., a new genus with sclecospores in Lentitheciaceae. *Cryptogamie, Mycologie*, 36(2), 225-236.
- Poole RW (1974).** An Introduction to Quantitative Ecology. (McGraw-Hill, Ed.). New York.
- Potisek, M., Likar, M., Vogel-Mikuš, K., Arčon, I., Grdadolnik, J., Regvar, M. (2021).** 1, 8-dihydroxy naphthalene (DHN)-melanin confers tolerance to cadmium in isolates of melanised dark septate endophytes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 222, 112493.
- Poveda, J., Eugui, D., Abril-Urías, P., & Velasco, P. (2021).** Endophytic fungi as direct plant growth promoters for sustainable agricultural production. *Symbiosis*, 85(1), 1-19.
- Poveda, J., Rodríguez, V. M., Díaz-Urbano, M., Sklenář, F., Saati-Santamaría, Z., Menéndez, E., & Velasco, P. (2022).** Endophytic fungi from kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) modify roots-glucosinolate profile and promote plant growth in cultivated *Brassica* species. First description of *Pyrenophora gallaeciana*. *Frontiers in microbiology*, 13, 981507.

Priyadharsini, P y T. Muthukumar 2017. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. *Fungal. Ecol.* 27: 69–77.

Rafiqi, M., Kosawang, C., Peers, J. A., Jelonek, L., Yvanne, H., McMullan, M., & Nielsen, L. R. (2023). Endophytic fungi related to the ash dieback causal agent encode signatures of pathogenicity on European ash. *IMA fungus*, 14(1), 10.

Ranelli, L.B., Hendricks, W.Q., Lynn, J.S., Kivlin, S.N., Rudgers, J.A., 2015. Biotic and abiotic predictors of fungal colonization in grasses of the Colorado Rockies. *Divers. Distrib.* 21, 962e976. <https://doi.org/10.1111/ddi.12310>.

Raza, A., Razzaq, A., Mehmood, S. S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., Xu, J. (2019). Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*, 8(2), 34.

Read, D. J., y Haselwandter, K. (1981). Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytologist*, 88(2), 341-352.

Redman RS Dunigan DD Rodriguez RJFungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader?, *New Phytologist*, 2001, vol. 151 (pg. 705-716)

Reininger, V., Grünig, C. R., & Sieber, T. N. (2012). Host species and strain combination determine growth reduction of spruce and birch seedlings colonized by root- associated dark septate endophytes. *Environmental Microbiology*, 14(4), 1064-1076.

Reininger, V., & Sieber, T. N. (2012). Mycorrhiza reduces adverse effects of dark septate endophytes (DSE) on growth of conifers.

Read, A.F. 1994. The evolution of virulence. *Trends Microbiol.* 2 73–76.

Regaldo, J. J., Berdion, V., Vignale, M. V., Novas, M. V., Pitta-Alvarez, S. I., & Iannone, L. J. (2018). The presence of *Epichloë* sp. in *Bromus auleticus* (Trin.) seeds enhances micropropagation and growth of micropropagated plantlets from these seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135, 279-286.

Richard, C., y Fortin, J. A. (1973). The identification of *Mycelium radicis atrovirens* (Phialocephala dimorphospora). *Canadian Journal of Botany*, 51(11), 2247-2248.

Rivas, H. Zanolli, C. (1908). La Tembladera. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*. UNLP. 5(1), 160-196.

Rivedal HM, Tabima JF, Stone AG and Johnson KB. 2022. Identity and pathogenicity of fungi associated with root, crown, and vascular symptoms related to winter squash yield decline. *Plant disease* 106(6):1660-1668. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-2090-RE>

Rodríguez, R.J., White, J.F., Arnold, A.E. y Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New phytologist*, 182(2), 314-330. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>

Rodriguez, R., y Readman, R. (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J Exp Bot*. 59(5):1109-14. doi: 10.1093/jxb/erm342

Rojas, X., Guo, J., Leff, J. W., McNear, D. H., Fierer, N., & McCulley, R. L. (2016). Infection with a shoot-specific fungal endophyte (*Epichloë*) alters tall fescue soil microbial communities. *Microbial ecology*, 72, 197-206.

Rothen, C. P. (2015). *Hongos endofitos septados en raíces de Glycine max: diversidad, caracterización y estudio de la interacción* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

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

Rothen, C., Miranda, V., Fracchia, S., Godeas, A., & Rodríguez, A. (2018). *Microdochium Bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 53(2), 1-10.

Rudgers, J. A., Afkhami, M. E., Rúa, M. A., Davitt, A. J., Hammer, S., & Huguet, V. M. (2009). A fungus among us: broad patterns of endophyte distribution in the grasses. *Ecology*, 90(6), 1531-1539.

Ruotsalainen, A. L., Kauppinen, M., Wäli, P. R., Saikkonen, K., Helander, M., & Tuomi, J. (2022). Dark septate endophytes: mutualism from by-products?. *Trends in Plant Science*, 27(3), 247-254.

Sadzawka RA, M.A. Carrasco R, R. Demanet F, H. Flores P, R. Grez Z, M.L. Mora G, Neaman A. 2007. *Métodos de Análisis de Tejidos Vegetales*. Santiago, Chile.

Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual review of Ecology and Systematics*, 29(1), 319-343.

Saikkonen, K. (2000). Kentucky 31, far from home. *Science*, 287(5460), 1887-1887.

Salgado Salomón M, Barroetaveña C y Rajchenberg M (2013). *Pseudotsuga menziesii* invasión in native forests of Patagonia, Argentina: What about mycorrhizas? *Acta Oecologica*, 49, 5-11. <http://doi.org/10.1016/j.actao.2013.01.018>

Sampangi-Ramaiah, M. H., Jagadheesh, Dey, P., Jambagi, S., Vasantha Kumari, M. M., Oelmueller, R., ... & Uma Shaanker, R. (2020). An endophyte from salt-adapted Pokkali rice

confers salt-tolerance to a salt-sensitive rice variety and targets a unique pattern of genes in its new host. *Scientific reports*, 10(1), 3237.

Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. S., & Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 188-196.

Santos, E. A. D., Ferreira, L. R., Costa, M. D., Silva, M. D. C. S. D., Reis, M. R. D., & França, A. C. (2013). Occurrence of symbiotic fungi and rhizospheric phosphate solubilization in weeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35, 49-55.

Santos, M., Cesanelli, I., Diánez, F., Sánchez-Montesinos, B., & Moreno-Gavíra, A. (2021). Advances in the role of dark septate endophytes in the plant resistance to abiotic and biotic stresses. *Journal of Fungi*, 7(11), 939.

Sarkar, T., Chakraborty, P., Karmakar, A., Saha, A., & Saha, D. (2019). First report of *Periconia macrospinosa* causing leaf necrosis of pointed gourd in India. *Journal of Plant Pathology*, 101, 1281-1281.

Sarkar, S., Dey, A., Kumar, V., Batiha, G. E. S., El-Esawi, M. A., Tomczyk, M., & Ray, P. (2021). Fungal endophyte: an interactive endosymbiont with the capability of modulating host physiology in myriad ways. *Frontiers in Plant Science*, 12, 701800.

Saxena, J., Saini, A., Ravi, I., Chandra, S., & Garg, V. (2015). Consortium of Phosphate-solubilizing Bacteria and Fungi for Promotion of Growth and Yield of Chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of Crop Improvement*, 29(3), 353–369. <https://doi.org/10.1080/15427528.2015.1027979>

Scervino, J. M., Mesa, M. P., Della Mónica, I., Recchi, M., Sarmiento Moreno, N., & Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and fertility of soils*, 46, 755-763.

Scervino, J. M., Papinutti, V. L., Godoy, M. S., Rodriguez, M. A., Della Monica, I., Recchi, M., ... & Godeas, A. M. (2011). Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of applied microbiology*, 110(5), 1215-1223.

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

Schardl, C. L., Grossman, R. B., Nagabhyru, P., Faulkner, J. R., & Mallik, U. P. (2007). Loline alkaloids: currencies of mutualism. *Phytochemistry*, 68(7), 980-996.

Schadt, C. W., Mullen, R. B., & Schmidt, S. K. (2001). Isolation and phylogenetic identification of a dark- septate fungus associated with the alpine plant *Ranunculus adoneus*. *New Phytologist*, 150(3), 747-755.

Schrey SD, Hartmann A, Hampp R (2015) Rhizosphere interactions. In: Krauss GJ, Nies DH (eds) Ecological biochemistry: environmental and interspecies interactions, vol 12. Wiley-VCH, Weinheim, pp 292–311. <https://doi.org/10.1002/9783527686063.ch15>

Schlaeppi, K., Bulgarelli, D. (2015). The plant microbiome at work. *Molecular Plant-microbe interactions*, 28(3), 212-217.

Schlaeppi, K., Dombrowski, N., Oter, R. G., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. 2014. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:585-592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321597111>

Schlegel, M., Münsterkötter, M., Güldener, U., Bruggmann, R., Duò, A., Hainaut, M., ... & Grünig, C. R. (2016). Globally distributed root endophyte *Phialocephala subalpina* links pathogenic and saprophytic lifestyles. *BMC genomics*, 17, 1-22.

Schneider, M., Grünig, C. R., Holdenrieder, O., & Sieber, T. N. (2009). Cryptic speciation and community structure of *Herpotrichia juniperi*, the causal agent of brown felt blight of conifers. *Mycological research*, 113(8), 887-896.

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

Schulz, B., Guske, S., Dammann, U., Boyle, C. (1998). Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-hostinteraction. *Symbiosis* 25, 213–227

Schulz, B., Boyle, C., (2005). The endophytic continuum. *Mycoligal Research*. 109, 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>

Schulz, B. (2006). Mutualistic interactions with fungal root endophytes. *Microbial root endophytes*, 261-279.

Selim, K., El-Beih, A. A., Abd El-Rahman, T. M. and EIDiwany, A. I., (2012) “Biology of endophytic fungi,” *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, vol. 2, no. 1, pp. 31–82

Semmartin M, Omacini M, Gundel PE, Hernández-Agramonte IM (2015) Broad-scale variation of fungal-endophyte incidence in temperate grasses. *J Ecol* 103:184–190

Shadmani, L.; Jamali, S.; Fatemi, A. (2021). Effects of root endophytic fungus, *Microdochium bolleyi* on cadmium uptake, translocation and tolerance by *Hordeum vulgare* L. *Biologia* , 76, 711–719.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.

Sheller, M. A., Shilkina, E. A., Ibe, A. A., Razdorozhnaya, T. Y., & Sukhikh, T. V. (2020). Phytopathogenic fungi in forest nurseries of Middle Siberia. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 13(6), 507.

Sidhoum, W., Dib, S., Alim, Y., Anseur, S., Benlatreche, S., Belaidouni, Z. M., & Chamouma, F. E. Z. (2024). Growth-promoting effects of *Aspergillus Elegans* and the dark septate endophyte (DSE) *Periconia macrospinosa* on cucumber. *Archives of Microbiology*, 206(5), 1-14.

Shimasaki T, Masuda S, Garrido-Oter R, Kawasaki T, Aoki Y, Shibata A, Suda W, Shirasu K, Yazaki K, Nakano RT, et al.: Tobacco root endophytic arthrobacter harbors genomic features enabling the catabolism of host-specific plant specialized metabolites. *mBio* 2021, 12, e00846. 21.

Sieber, T. N. (2002). Fungal root endophytes. In Plant roots (pp. 1369-1418). CRC Press.

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

Sieber, T. N., & Grünig, C. R. (2006). Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* sl. In *Microbial root endophytes* (pp. 107-132). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

Siless, G. E., Gallardo, G. L., Rodriguez, M. A., Rincón, Y. A., Godeas, A. M., Cabrera, G. M. (2018). Metabolites from the dark septate endophyte *Drechslera* sp. evaluation by LC/MS and principal component analysis of culture extracts with histone deacetylase inhibitors. *Chemistry & biodiversity*, 15(8), e1800133.

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

Sims, J. T., y Sharpley, A. N. (2005). *Phosphorus: agriculture and the environment* (pp. xxiii+-1121).

Singh, G., y Mukerji, K. G. (2006). Root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity. In *Microbial activity in the rhizosphere* (pp. 39-53). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Singh G, Agrawal H, Bednarek P: 2023. Specialized metabolites as versatile tools in shaping plant–microbe associations. *Mol Plant*, 16:122–144

Smeck, N E. (1985). Phosphorus dynamics in soils and landscape. *Geoderma* 36:185-199

Smith, F. A. (1996). Mutualism and parasitism: diversity in function and structure in the 'arbuscular'(VA) mycorrhizal symbiosis. *Adv. Bot. Res.*, 22, 1-43.

Smith, S. E., y Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Slaughter, L.C., McCulley, R.L., 2016. Aboveground *Epichloë coenophiala*-grass associations do not affect belowground fungal symbionts or associated plant, soil parameters. *Microb. Ecol.* 72, 682–691.

Slaughter, L.C., Nelson, J.A., Carlisle, E., Bourguignon, M., Dinkins, R.D., Phillips, T.D., McCulley, R.L., 2018. Climate change and *Epichloë coenophiala* association modify belowground fungal symbioses of tall fescue host. *Fungal Ecol.* 1, 37–46.

Slaugther, L.C., Nelson, J.A., Carlisle, A.E., Bourguignon, M., Dinkins, R.D., Phillips, T.D., McCulley, R.L., 2019. *Tall fescue* and *E. coenophiala* genetics influence root- associated soil fungi in a temperate Grassland. *Front. Microbiol.* 10, 2380.

Spagnoletti, F.N., Tobar N.E., Fernández Di Pardo, A., Chiocchio, V.M. y Lavado R.S. (2017). Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Appl Soil Ecol*, 111, pp. 25-32

Srinivasan, R., Yandigeri, M. S., Kashyap, S., & Alagawadi, A. R. (2012). Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. *Saudi journal of biological sciences*, 19(4), 427-434.

Stefanoni Rubio, P. J., Godoy, M. S., Della Mónica, I. F., Pettinari, M. J., Godeas, A. M., & Scervino, J. M. (2016). Carbon and nitrogen sources influence tricalcium phosphate solubilization and extracellular phosphatase activity by *Talaromyces flavus*. *Current microbiology*, 72, 41-47.

Stefanoni Rubio, P. J. (2019). Efecto de *Epichloë* sobre la germinación y el rendimiento de *Bromus auleticus* bajo condiciones de estrés y en asociación a hongos solubilizadores de fósforo Tesis. FCEN-UBA.

Stewart, J.W.B.; Tiessen, H. Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry* 1987, 4, 41–60.

Stoyke, G., & Currah, R. S. (1991). Endophytic fungi from the mycorrhizae of alpine ericoid plants. *Canadian Journal of Botany*, 69(2), 347-352.

Su, Z. Z., Dai, M. D., Zhu, J. N., Liu, X. H., Li, L., Zhu, X. M., ... Lin, F. C. (2021). Dark septate endophyte *Falciphora oryzae*-assisted alleviation of cadmium in rice. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126435.

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

Tanaka, A., Tapper, B. A., Popay, A., Parker, E. J., & Scott, B. (2005). A symbiosis expressed non- ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular microbiology*, 57(4), 1036-1050.

Tanney, J. B., Douglas, B., & Seifert, K. A. (2016). Sexual and asexual states of some endophytic *Phialocephala* species of *Picea*. *Mycologia*, 108(2), 255-280.

Taylor TN, Klavins SD, Krings M, Taylor EL, Kerp H, Hass H. 2004. Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh, Earth Sciences* 94: 457–473.

Taylor TN, Krings M. 2005. Fossil microorganisms and land plants: Associations and interactions. *Symbiosis* 40: 119–135.

Taylor TN, Krings M, Kerp H. 2006. *Hassiella monospora* nov. gen. et sp., a microfungus from the 400 million year old Rhynie chert. *Mycological Research* 110: 628– 632.

Tellenbach, C., Grünig, C. R., & Sieber, T. N. (2011). Negative effects on survival and performance of Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate- dependent. *Environmental Microbiology*, 13(9), 2508-2517.

Terlizzi, N. L. (2018). "Aislamiento e identificación de endofitos septados asociados a las raíces de *Bromus auleticus* en simbiosis con endofitos de vástago *Epichloë*". Tesis de Grado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Terlizzi, N. L., Rodríguez, M. A., Iannone, L. J., Lanari, E., & Novas, M. V. (2022). Epichloë endophyte affects the root colonization pattern of belowground symbionts in a wild grass. *Fungal Ecology*, 57, 101143

Thitla, T.; Kumla, J.; Khuna, S.; Lumyong, S.; Suwannarach, N. Species Diversity, Distribution, and Phylogeny of Exophiala with the Addition of Four New Species from Thailand. *J. Fungi* 2022, 8, 766. <https://doi.org/10.3390/jof8080766>

Thompson BD, Grave TS, Malajczuk N et al (1994) The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labil. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytol* 126:517–524. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb04250.x

Thoms D, Liang Y, Haney CH. Maintaining Symbiotic Homeostasis: How Do Plants Engage With Beneficial Microorganisms While at the Same Time Restricting Pathogens? *Mol Plant Microbe Interact*. 2021 May;34(5):462-469. doi: 10.1094/MPMI-11-20-0318-FI. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33534602.

Tienaho, J., Karonen, M., Muilu–Mäkelä, R., Wähälä, K., Leon Denegri, E., Franzén, R., ..., Sarjala, T. (2019). Metabolic profiling of water-soluble compounds from the extracts of dark septate endophytic fungi (DSE) isolated from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings using UPLC–Orbitrap–MS. *Molecules*, 24(12), 2330.

Toledo, A. V., Franco, M. E. E., Lopez, S. M. Y., Troncozo, M. I., Saparrat, M. C. N., & Balatti, P. A. (2017). Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiological and molecular plant pathology*, 99, 2-6.

Tardy, L., Giraudeau, M., Hill, G.E., McGraw, K.J. & Bonneaud, C. (2019) Contrasting evolution of virulence and replication rate in an emerging bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 16927–16932.

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

Tuckmantel, T.; Leuschner, C.; Preusser, S.; Kandeler, E.; Angst, G.; Mueller, C.W.; Meier, I.C. Root Exudation Patterns in a Beech Forest: Dependence on Soil Depth, Root Morphology, and Environment. *Soil. Biol. Biochem.* 2017, 107, 188–197.

Turner, B.L.; Papházy, M.J.; Haygarth, P.M.; McKelvie, I.D. Inositol phosphates in the environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2002, 357, 449–469.

Ünal, F. (2024). Phylogenetic analysis of *Microdochium* spp. associated with turfgrass and their pathogenicity in cereals. *PeerJ*, 12, e16837.

Upson, R., Read, D. J., & Newsham, K. K. (2009). Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza*, 20, 1-11.

Urcelay, C. (2002). Co-occurrence of three fungal root symbionts in *Gaultheria poeppiggi* DC in Central Argentina. *Mycorrhiza*, 12(2), 89-92.

Usuki F, Narisawa K. (2005) Formation of structures resembling ericoid mycorrhizas by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* within roots of *Rhododendron obtusum* var. *kaempferi*. *Mycorrhiza* 2005;15:61-64

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

Vandegrift, R., Bitty, R.A., Laurel, P.M., 2015. The herbaceous landlord: integrating the effects of symbiont consortia within a single host. *PeerJ* 3, e1379.

van der Heijden M.G.A., Bardgett R.D., van Straalen N.M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 2008;11:296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.

Vantarakis, A. (2021). Eutrophication and public health. Chemical Lake Restoration: Technologies, Innovations and Economic Perspectives, 23-47.

Venkateswarlu, B., Rao, A. V., & Raina, P. (1984). Evaluation of phosphorus solubilisation by microorganisms isolated from Aridisols. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 32(2), 273-277.

Vergara, C., Araujo, K. E., Urquiaga, S., Schultz, N., Balieiro, F. D. C., Medeiros, P. S., ... & Zilli, J. E. (2017). Dark septate endophytic fungi help tomato to acquire nutrients from ground plant material. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2437.

Vergara, C., Araujo, K. E. C., Sperandio, M. V. L., Santos, L. A., Urquiaga, S., & Zilli, J. É. (2019). Dark septate endophytic fungi increase the activity of proton pumps, efficiency of 15 N

recovery from ammonium sulphate, N content, and micronutrient levels in rice plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50, 825-838.

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

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

Vignale MV, Iannone LJ, Scervino JM y Novas MV (2018). *Epichloë* exudates promote *in vitro* and *in vivo* arbuscular mycorrhizal fungi development and plant growth. *Plant Soil*. DOI 10.1007/s11104-017-3173-5

Vignale, M.V., Iannone, L.J., Novas, M.V., 2020. *Epichloë* endophytes of a wild grass promote mycorrhizal colonization of neighbor grasses. *Fungal Ecol*, 45, p. 100916.

Vignale, M. V., Rocca, L. O., Soria, M., Iannone, L. J., & Novas, M. V. (2023). Ecotype and fungal endophyte status differentially affect soil arbuscular mycorrhizal community of the native grass *Bromus auleticus*. *Rhizosphere*, 27, 100757.

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

Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology*, 132(1), 44-51.

Wang, C. J. K., & Wilcox, H. E. (1985). New species of ectendomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phialophora finlandia*, *Chloridium paucisporum*, and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia*, 77(6), 951-958.

Wang, Q., Wang, C., Yu, W., Turak, A., Chen, D., Huang, Y., ... & Huang, Z. (2018). Effects of nitrogen and phosphorus inputs on soil bacterial abundance, diversity, and community composition in Chinese fir plantations. *Frontiers in microbiology*, 9, 1543.

Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 2955-2965.

Wei, Y.K., Gao, Y.B., Xu, H., Su. D., Zhang, X., Wang, Y.H., Lin, F., Chen, L., Nie, L.Y. y Ren, A.Z. (2006). Occurrence of endophytes in grasses native to northern China. *Grass Forage Sci* 61:422–429

Wei, D. P., Wanasinghe, D. N., Hyde, K. D., Mortimer, P. E., Xu, J., Xiao, Y. P., ... & To-Anun, C. (2019). The genus *Simplicillium*. *MycoKeys*, 60, 69.

Wheeler, M. H. (1983). Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(1), 29-36.

Wheeler, D. L., Dung, J. K. S., & Johnson, D. A. (2019). From pathogen to endophyte: an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. *New Phytologist*, 222(1), 497-510.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a. guide to methods and applications* 18, 315–322.

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

Wong, P. T. W., Tan, Y. P., Weese, T. L., & Shivas, R. G. (2022). Magnaportheopsis species associated with patch diseases of turfgrasses in Australia. *Mycosphere Online: Journal of Fungal Biology*, 13(1), 602-611.

Xiao, J.; Liang, T.; Yang, S.; Tan, H. Can Sugarcane Yield and Health Be Altered with Fully Mechanized Management? *Agronomy* 2023, 13, 153. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010153>

Xu, R., Li, T., Shen, M., Yang, Z. L., & Zhao, Z. W. (2020). Evidence for a dark septate endophyte (*Exophiala pisciphila*, H93) enhancing phosphorus absorption by maize seedlings. *Plant and Soil*, 452, 249-266.

Yakti, W., Kovács, G. M., Vági, P., & Franken, P. (2018). Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5-6), 637-648.

Yakti, W., Kovacs, G. M., & Franken, P. (2019). Differential interaction of the dark septate endophyte *Cadophora* sp. and fungal pathogens *in vitro* and *in planta*. *FEMS microbiology ecology*, 95(12), fiz164.

Yang, Y., Zuzak, K., Harding, M., Neilson, E., Feindel, D., & Feng, J. (2017). First report of pink root rot caused by *Setophoma* (*Pyrenophaeta*) *terrestris* on canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(3), 354-360.

Yinli, B. I., Linlin, X. I. E., Xiao, W. A. N. G., & Yang, Z. H. O. U. (2024). Phosphorus reward mechanisms of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes: Synergism or competition in plant carbon allocation?. *Pedosphere*.

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

Yoshida, N. (2022). Seasonal dynamics of the pink root fungus (*Setophoma terrestris*) in rhizosphere soil: Effect of crop species and rotation. *Plant Pathology*, 71(2), 361-372.

- Young**, C.A., Schardl, C.L., Panaccione, D.G., Florea, S., Takach, J.E., Charlton, N.D., Moore, N., Webb, J.S., Jaromczyk, J., (2015). Genetics, genomics and evolution of ergot alkaloid diversity. *Toxins* 7, 1273–1302.
- Yu** T, Nassuth A, Peterson RL (2001) Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Can J Bot* 47:741–753
- Yuan**, Z. L., Lin, F. C., Zhang, C. L., & Kubicek, C. P. (2010). A new species of Harpophora (Magnaportheaceae) recovered from healthy wild rice (*Oryza granulata*) roots, representing a novel member of a beneficial dark septate endophyte. *FEMS microbiology letters*, 307(1), 94-101.
- Yung**, L., Blaudez, D., Maurice, N., Azou-Barré, A., Sirguey, C. (2021). Dark septate endophytes isolated from non-hyperaccumulator plants can increase phytoextraction of Cd and Zn by the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(13), 16544-16557.
- Zaffarano**, P. L., Queloz, V., Duò, A., & Grünig, C. R. (2011). Sex in the PAC: A hidden affair in dark septate endophytes?. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 1-14.
- Zeilinger**, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., ... Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS microbiology reviews*, 40(2), 182-207.
- Zhan**, J., Mundt, C.C., Hoffer, M. & McDonald, B.A. (2002) Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 634–647.
- Zhan**, F., He, Y., Zu, Y., Li, T., & Zhao, Z. (2011). Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2483-2489.
- Zhan**, F., He, Y., Yang, Y., Li, Y., Li, T., & Zhao, Z. (2016). Effects of tricyclazole on cadmium tolerance and accumulation characteristics of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96, 235-241.
- Zhan, F., Xie, Y., Zhu, W., Sun, D., McDonald, B.A. & Zhan, J. (2016) Linear correlation analysis of *Zymoseptoria tritici* aggressiveness with *in vitro* growth rate. *Phytopathology*, 106, 1255–1261.
- Zhang**, X., Ren, A. Z., Wei, Y. K., Lin, F., Li, C., Liu, Z. J., & Gao, Y. B. (2009). Taxonomy, diversity and origins of symbiotic endophytes of *Achnatherum sibiricum* in the Inner Mongolia Steppe of China. *FEMS microbiology letters*, 301(1), 12-20.
- Zhang**, H., Tang, M., Chen, H., Wang, Y., & Ban, Y. (2010). Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes colonization status in medicinal plant *Lycium barbarum* L. in arid Northwestern China. *Afr J Microbiol Res*, 4(18), 1914-1920.

Zhang, W., Card, S.D., Mace, W.J., Christensen, M.J., McGill, C.R., y Matthew, C. (2017). Defining the pathways of symbiotic *Epichloë* colonization in grass embryos with confocal microscopy. *Mycologia* 109: 153-161

Zhang FB, Zheng HL, Zhang MQ, Yin YS, Cui M and Gao M. 2019. First report of *Setophoma terrestris* causing pink root of garlic in China. *Plant Disease* 103(3): 584 <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0530-PDN>

Zhu, Z. B., Fan, J. Y., Guo, Q. S., Liu, Z. Y., & Zhu, G. S. (2015). The growth and medicinal quality of *Epimedium wushanense* are improved by an isolate of dark septate fungus. *Pharmaceutical Biology*, 53(9), 1344-1351.

Zhu, X. K., Li, C. Y., Jiang, Z. Q., Huang, L. L., Feng, C. N., Guo, W. S., & Peng, Y. X. (2012). Responses of phosphorus use efficiency, grain yield, and quality to phosphorus application amount of weak-gluten wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(7), 1103-1110.

ANEXO

Material Suplementario

Agar Extracto de Malta (AEM)

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

Caldo Extracto de Malta (CEM)

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

Glucosa-Asparagina (GA)

Glucosa	10 g
Asparagina	4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
HK ₂ PO	40,6 g
H ₂ KPO	40,5 g
Agua destilada	1000ml
Solución de micronutrientes A*	2 ml
Solución de micronutrientes B*	2 ml
Tiamina**	100 µl
Biotina**	50µl

*Solución de Micronutrientes A (ver guía Micología Experimental – FCEyN-UBA) *Solución de Micronutrientes B (ver guía Micología Experimental – FCEyN- UBA)

Solución de Hoagland

Las soluciones madres se preparan por separado ya que algunos compuestos pueden precipitar. Los compuestos se pesan y cada solución se autoclava.

Macronutrientes se preparan al 100X

KNO ₃	1.25 mM
MgSO ₄	0.75 mM
Ca(NO ₃) ₂	1.5 mM
KH ₂ PO ₄	0.5 mM

Micronutrientes se preparan al 1000x

FeEDTA.....	50 M
H ₃ BO ₃	50 M
MnSO ₄	12 M
CuSO.....	0.70 M
ZnSO ₄	1 M
MoO ₄ Na ₂	0.24 M
Na ₂ SiO ₃	100 M

National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) (Nautiyal, 1999):

Glucosa	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
KCl	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ ,	0.1 g
Agar.....	15g
Agua destilada.....	1000 mL

Aclaración: En aquellos tratamientos en los cuales la fuente de P no fue Ca₃(PO₄)₂, se reemplazó con igual cantidad de moles de P con la fuente de P alternativa.

Curva de calibración

Curva	C. K ₂ HPO ₄	C. PO ₄	vi. Sc madre (8g/l)µl	NBRIP µl
1	0	0	0	1000
2	0.096	0.0523	12	988
3	0.12	0.0654	15	985
4	0.136	0.0741	17	983
5	0.16	0.0863.	20	980
6	0.168	0.0915	21	979

TINCIÓN DE RAÍCES (Phillips y Hayman, 1970)

Lavado de las raíces bajo agua para eliminar los restos de fijador.

-Clarificación sumergiendo las raíces en una solución de KOH 10 % durante 30 minutos a 90 °C.

-Enjuague con agua de la canilla.

-Inmersión en solución de HCl 1 % durante 3 minutos.

-Tinción con Trypan Blue (0,05 %) al lactofenol por 15 minutos a 90 °C. -

Preservación en ácido láctico para su posterior observación.