



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**

**DIVERSIDAD DE HONGOS ENDOFITOS EN *Paspalum*, SU EFECTO SOBRE LOS  
PATÓGENOS FÚNGICOS Y EL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE LA PLANTA**

**Ing. Agr. (Mgter.) Mara Belén Depetris**

**Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el  
Área Recursos Naturales**

**Directora**

**Dra. Silvina A. Felitti**

**Co-Director**

**Dr. Carlos A. Acuña**

**Ciudad de Corrientes, República Argentina**

## **DIVERSIDAD DE HONGOS ENDOFITOS EN *Paspalum*, SU EFECTO SOBRE LOS PATÓGENOS FUNGICOS Y EL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE LA PLANTA**

Mara B. Depetris

Ingeniera Agrónoma (Magister en Genética Vegetal), FCA-UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el Área Recursos Naturales, y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias (IICAR-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR) y en el Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste bajo la dirección de la Dra. Silvina A. Felitti y el Dr. Carlos A. Acuña.

Dra. Silvina A. Felitti .....

Dr. Carlos A. Acuña .....

Ing. Agr. (Mgter.)

Mara B. Depetris .....

Fecha de defensa: .....

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora, la Dra. Silvina Felitti y a mi codirector, Dr. Carlos Acuña, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis, por el asesoramiento permanente, por el apoyo y el tiempo dedicado, por su voluntad y disposición para formarme académicamente.

A la Dra. Susana Gutierrez, por la valiosa contribución en la clasificación de los endofitos obtenidos, y por su invaluable dedicación en el área de fitopatología que ha mejorado la calidad de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR) y de la Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE), por permitirme disponer de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca brindada para esta investigación.

A cada uno de los que pertenecen a la Sala de Estudios de Posgrado, porque todos han contribuido a mi formación evacuando dudas durante la realización de esta tesis.

En especial, a mi familia y amigos, por el aliento permanente y por su apoyo desmedido frente a las dificultades en el desarrollo de esta investigación.

A todos ellos, muchas gracias!!

*Tell me, and I will forget. Show me, and I may remember.  
Involve me, and I will understand. Confucius, circa 450 BC.*

## PUBLICACIONES

**Depetris, M. B., Acuña, C. A., Gutierrez, S., Marcón, F., & Felitti, S. A. (2020).** Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. **Grass and Forage Science**, 75:316-325. doi: [10.1111/gfs.12494](https://doi.org/10.1111/gfs.12494)

**Depetris, M. B., Acuña, C. A., Marcón, F., Gutierrez, S., Felitti, S. A. (2020).** Evaluación de la capacidad de hongos endofitos como controladores de enfermedades en *Paspalum* mediante pruebas *in vitro*. **IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina**. Modalidad virtual.

**Depetris, MB; Acuña CA; Gutiérrez S, Felitti, SA. (2018).** Diversidad de Hongos Endofitos en *Paspalum* y su Efecto Sobre el Comportamiento Agronómico de la Planta. Santiago de Chile, Chile. Revista. Resumen. Congreso. **XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018**. Asociación Latinoamericana de Microbiología.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
PUBLICACIONES	4
ÍNDICE	5
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS	8
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>13</b>
ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	14
ORIGEN Y FUNDAMENTO DE LA INVESTIGACIÓN - Hipótesis	18
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
BIBLIOGRAFÍA	21
<b>CAPÍTULO II: DIVERSIDAD ENDOFITA EN <i>Paspalum</i></b> .....	<b>24</b>
OBJETIVO ESPECÍFICO 1	24
INTRODUCCIÓN	25
La simbiosis y los hongos endofitos	25
la micobiota endofita asociada a pasturas	26
Las pasturas en Argentina	27
Factores modificadores de la diversidad endofita	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Sitio de estudio y toma de muestras	30
Aislamiento del hongo endofito	32
Identificación taxonómica de hongos endofitos	33
Clasificación morfológica	33
Clasificación molecular	34
Análisis de datos	35
RESULTADOS	36
Especies fúngicas aisladas de las gramíneas estudiadas	36
Géneros de hongos endofitos aislados	37
Clasificación morfológica y descripción taxonómica de las especies de hongos endofitos aislados	43
Clasificación molecular y desarrollo de árboles filogenéticos	63
Diversidad endofita en distintas situaciones / condiciones	65
Diversidad endofita en diferentes especies de <i>Paspalum</i> y regiones climáticas	65
Diversidad endofita en distintos momentos fenológicos	68

Diversidad endofita en diferentes ecosistemas	71
DISCUSIÓN	73
Diversidad endofita en diferentes especies de <i>Paspalum</i> y regiones climáticas	74
Diversidad endofita en distintos momentos fenológicos	76
Diversidad endofita en diferentes ecosistemas	77
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
<b>CAPITULO III: ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DE LA INTERACCIÓN ENDOFITO - PATÓGENO .</b>	<b>87</b>
OBJETIVO ESPECÍFICO 2	87
INTRODUCCIÓN	88
Antecedentes de especies utilizadas como antagonistas	90
Antecedentes de especies utilizadas como patógenos	92
MATERIALES Y MÉTODOS	94
Evaluación del antagonismo por cultivo doble	94
Evaluación del antagonismo por producción de metabolitos volátiles	95
Evaluación del antagonismo por técnica de excavación - placa cultivo	96
RESULTADOS	99
Prueba de antagonismo - cultivo doble	99
Evaluación del antagonismo por producción de metabolitos volátiles	104
Prueba de actividad antimicrobiana mediante técnica de excavación - placa cultivo	107
DISCUSIÓN	110
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	118
<b>CAPITULO IV: EFECTO SOBRE LOS COMPONENTES AGRONÓMICOS Y ANÁLISIS <i>IN PLANTA</i> DE LA INTERACCIÓN .....</b>	<b>123</b>
OBJETIVO ESPECÍFICO 3	123
OBJETIVO ESPECÍFICO 4	123
INTRODUCCIÓN	124
Efecto de los endofitos en el crecimiento vegetal	124
Efecto de los endofitos sobre patógenos fúngicos	125
MATERIALES Y MÉTODOS	128
Material vegetal	128
Medición de parámetros agronómicos	128
Evaluación del control de ergot <i>in planta</i> :	131
RESULTADOS	137
Medición de parámetros agronómicos	137

Evaluación del control de ergot <i>in planta</i> :	138
DISCUSIÓN	142
Medición de parámetros agronómicos	142
Evaluación del control de ergot <i>in planta</i> :	144
CONCLUSIONES	150
BIBLIOGRAFÍA	151
<b>CAPITULO V: COMENTARIOS FINALES.....</b>	<b>158</b>
CONCLUSIONES ABORDADAS	159
APLICACIONES POTENCIALES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	161
INVESTIGACIÓN FUTURA	162
BIBLIOGRAFÍA	164

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

(A): Pradera.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de la variancia (ANalysis Of VAriance).

(B): Sabana dominada por Timbó.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

bp: Par de bases (base pair, bp).

brlA: Gen regulador involucrado en la conidiación.

C: Clavicipitáceos.

(C): Sabana de Quebracho colorado.

CIC: Categorías de inhibición del crecimiento.

cm: Centímetro.

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono.

cv.: Cultivar.

C<sub>3</sub>: Plantas que utilizan sólo el ciclo de Calvin para la fijación del dióxido de carbono del aire.

C<sub>4</sub>: Plantas que el producto inmediato de la fijación del dióxido de carbono está formado por 4 carbonos.

DBCA: Diseño en bloques completamente aleatorizados.

DDBJ database: Banco de datos de ADN de Japón (DNA Data Bank of Japan).

DE: Desvío estándar.

DME: Diferencia de medias estandarizada, prueba de LSD Fisher.

E-: Plantas libres de endofito.

E+: Plantas con presencia de endofito.

F: Floración.

g: Gramo.



h: Hora.

ha: Hectárea.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico.

ID: Identificación.

ITS: Región ITS (Internal Transcribed Spacer).

KR: Radio del patógeno desde el centro del punto de inoculación hacia el borde de la colonia en el cultivo control.

Kg: Kilogramo.

l: Litro.

Log base 10: Logaritmo decimal.

LSD: Prueba de Mínima Diferencia Significativa (Least Significant Difference).

m: Metro.

mg: Miligramo.

min: Minuto.

ml: Mililitro.

mm: Milímetro.

msnm: Metros sobre el nivel del mar.

mg/ml: Miligramo por mililitro.

m/v: Masa volumen.

NC: No Clavicipitáceos.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information).

Nº - nº: Número.

p: Nivel de significancia.

pb: Par de bases.

PD: *Paspalum dilatatum*.

PDA: Agar papa dextrosa (Potato Dextrose Agar).

PGI: Porcentaje de inhibición del crecimiento (Percentage Growth Inhibition).

pH: Potencial hidrógeno.

PN: *Paspalum notatum*.

Rep: Número de repetición.

R1: Radio del patógeno desde el centro del punto de inoculación hacia el borde de la colonia en dirección a la colonia antagonista en el cultivo doble.

sp.: Especie.

spp.: Especies.

SPAD: Contenido relativo de clorofila (Soil Plant Analysis Development).

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA.

V: Vegetativo.

v/v: Volumen volumen.

w: Watt.

x: Aumento del objetivo en microscopio óptico.

%: Porcentaje.

°C: Grados Celsius.

µg: Microgramos ( $10^{-6}$  g).

µl: Microlitro ( $10^{-6}$  l).

µm: Micrómetro ( $10^{-6}$  m).

## RESUMEN

En los ecosistemas naturales, las plantas parecen estar en simbiosis con diversos hongos endofitos que pueden tener impactos en las comunidades vegetales. *Paspalum* es uno de los géneros de gramíneas más importantes de los pastizales de América del Sur. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de hongos endofitos en dos especies de *Paspalum* y evaluar sus efectos sobre el crecimiento de las plantas y sobre los hongos patógenos causantes de enfermedades. Se recolectaron ochenta y cuatro muestras de plantas de *Paspalum notatum* en un pastizal en el noreste de Argentina, y sesenta de *Paspalum dilatatum* en el centro de Argentina. Se realizó un proceso de triple esterilización sumergiendo pequeños trozos de hojas y tallos para el aislamiento de hongos endofitos de las plantas recolectadas. Para la identificación se analizaron los caracteres morfológicos y las secuencias fúngicas correspondientes a la región ITS (Internal Transcribed Spacer). Se identificaron un total de diez géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Se realizó un ensayo en invernadero para determinar los efectos de los hongos endofitos sobre el crecimiento vegetal. El tratamiento con agua caliente eliminó los hongos preexistentes de las semillas. Las libres de endofitos (E-) se esterilizaron en la superficie y se germinaron asépticamente en placas de Petri. La mitad de las plántulas E- se inocularon para obtener plantas E+. Los resultados mostraron que *Trichoderma amazonicum* aumentó significativamente el contenido relativo de clorofila en *P. notatum* y *Acremonium strictum* el número de macollos y la biomasa aérea y radical en *P. dilatatum*. A su vez, se realizaron pruebas de campo y laboratorio para determinar los efectos de los hongos endofitos sobre el patógeno *Claviceps paspali*. Se observó un efecto significativo de los dos endofitos evaluados (*T. amazonicum* y *A. strictum*), aumentando el número de semillas sanas y el peso en ambos forrajes estudiados. En conclusión, se logró describir la diversidad de hongos endofitos presentes y se demostró que algunos aspectos del crecimiento y del control de patógenos fúngicos en *Paspalum* parecen verse afectados positivamente por las especies *T. amazonicum* y *A. strictum*.

## ABSTRACT

In natural ecosystems, plants appear to be in symbiosis with diverse fungal endophytes which can have impacts on plant communities. *Paspalum* is one of the most important grass genera in South American grasslands. The aim of this work was to determine the presence of fungal endophytes in two *Paspalum* species and evaluate their effects on plant growth and on disease-causing fungal pathogens. Eighty-four plant samples were collected from *Paspalum notatum* in a rangeland in northeastern Argentina, and sixty for *Paspalum dilatatum* in central Argentina. A triple-sterilization process was carried out by submerging small pieces of leaves and stems for the isolation of fungi from the collected plants. In order to identify endophytes, morphological characters and fungal sequences corresponding to the ITS (Internal Transcribed Spacer) region were analysed. A total of ten genera were identified: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Trichoderma*. A greenhouse trial was conducted to determine the effects of fungal endophytes on growth. A hot water treatment removed preexisting endophytic fungi from seeds. Endophyte free seeds (E-) were surface-sterilized and aseptically germinated in Petri plates. The half of E- seedlings were inoculated to obtain E+ plants. The results showed that *Trichoderma amazonicum* significantly increased relative chlorophyll content in *P. notatum* and *Acremonium strictum* increased tiller number, and above and below ground biomass in *P. dilatatum*. Moreover, field and lab trials were performed in order to determine fungal endophytes effects on the pathogen *Claviceps paspali*. A significant effect of the two endophytes evaluated has observed (*T. amazonicum* and *A. strictum*), increasing the number of healthy seeds and weight in both forages studied. In conclusion, the diversity of fungal endophytes present was described and some aspects of growth and fungal pathogens control in *Paspalum* seem to be positively affected by *T. amazonicum* y *A. strictum*.

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL**

## ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

El término *endofito* se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar aquellos organismos fúngicos que viven dentro de las plantas (Gamboa *et al.*, 2006). El significado de este término ha sido redefinido para incluir todos los organismos que, en algún momento de su ciclo de vida, viven de manera asintomática dentro de tejidos vegetales vivos; pueden hallarse en espacios intercelulares, en los conductos xilemáticos e incluso en raíces. Se diferencian de las micorrizas porque no se observan hifas en el exterior de la raíz (Saikkonen *et al.*, 1998). Sin embargo, el término puede comprender tanto hongos saprófitos como patógenos latentes. Estos últimos pueden producir síntomas sobre su hospedante cuando el tejido en el que habitan se debilita o empieza a morir (Petrini, 1991).

Los hongos endofitos forman con sus hospedantes relaciones simbióticas complejas confiriendo beneficios que pueden resultar mutuos, utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y esta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Salgado y Cepero, 2005). En la actualidad, existe un gran número de interrogantes acerca del funcionamiento de esta simbiosis, como saber con mayor profundidad qué beneficio reciben tanto las plantas como los hongos de esta asociación (Benavente *et al.*, 2008).

La capacidad de colonizar los tejidos internos del huésped, ha hecho valiosos a los endofitos como una potencial herramienta para mejorar el rendimiento de los cultivos (Lacava y Azevedo, 2014). A causa de la interacción con hongos endofitos, ocurren cambios fisiológicos dentro de las plantas. Se produce un incremento en la tasa fotosintética y se promueve la absorción de fosfatos en planta, tolerancia al estrés salino y resistencia a enfermedades (Gamboa *et al.*, 2006; Gundel *et al.*, 2013).

En 1998, Clay postuló otros beneficios para la planta hospedante de endofitos, como el aumento en el crecimiento y una mayor resistencia a organismos patógenos. Los estudios demuestran claramente que los endofitos causan efectos negativos en los herbívoros (Clay *et al.*, 2002). Por otra parte, Omacini *et al.* (2011) reportaron una reducción de la biomasa de la raíz de plantas hospedantes, del porcentaje de colonización micorrícica y una producción significativa de exudados radiculares por la presencia de hongos endofitos, pero la respiración del suelo y la descomposición del material vegetal no se vieron afectadas significativamente. Sin embargo, Gundel *et al.* (2013) reportaron que los beneficios de la interacción planta-hongo endofito parecen ser altamente dependientes del cultivar del pasto, la cepa y las condiciones ambientales.

La mayoría de los estudios han estado focalizados en especies de ciclo invernal, particularmente en festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.). Los animales bajo pastoreo,

desarrollan a menudo una condición crónica, especialmente en verano, denominada “festucosis”. Caracterizada por baja palatabilidad, frecuencia de abortos, animales nacidos muertos, retención de placentas, cantidad inadecuada de leche. A mediados de los años 1970, científicos del USDA en Georgia asociaron un hongo endofítico con bajas ganancias de peso, el cual fue originalmente identificado como *Epichloë typhina* (Ball *et al.*, 1991) y actualmente llamado *Epichloë coenophiala* (Leutschmann *et al.*, 2014). Dicho organismo no afecta ni el crecimiento ni la aparición de la pastura y requiere un análisis de laboratorio para detectar su presencia, se transmite vía semilla y, aparentemente, no se transmite de otra manera. Por lo tanto, una vez que se ha establecido un lote no infectado, se puede esperar que siga siéndolo a menos que se introduzcan y establezcan semillas infectadas (Ball *et al.*, 1991).

Rojas *et al.* (1995) realizaron un estudio en Chile, sobre el efecto del hongo endofito de *F. arundinacea* (*N. coenophialum*) sobre la ganancia de peso vivo en novillos a pastoreo. En este estudio se utilizaron pasturas con niveles de infección superiores al 60%, las cuales fueron comparadas con otras libres de infección. El incremento en el peso vivo de los novillos mostró aumentos significativos cuando se alimentaron de la pastura libre de endofito, mientras que el menor aumento se registró con presencia del mismo. De esta manera, se concluyó que la infección con el hongo *N. coenophialum* provoca menores incrementos de peso vivo en los animales que la consumen y una menor producción de carne por hectárea.

Pocos fueron los estudios realizados en especies estivales. En particular, en el caso de *Brachiaria* se demostró que los áfidos prefieren alimentarse de plantas no infectadas con hongos endofitos, a causa de la producción de metabolitos tóxicos de origen fúngico (CIAT, 1998).

Las gramíneas del género *Paspalum* constituyen la base forrajera de numerosas explotaciones ganaderas. Estas gramíneas, así como otras especies vegetales, establecen simbiosis con hongos que son importantes en la estructura, función y salud de las comunidades de plantas (Sánchez Márquez *et al.*, 2008). Dadas las características expresadas, se resalta la importancia de poder investigar la simbiosis de los hongos endofitos con especies gramíneas y establecer posibles efectos en el control biológico de plagas.

*Paspalum dilatatum* Poir es una gramínea perenne tropical a subtropical, con ciclo estival, originaria de América meridional. Es nativa de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay. En Argentina, se encuentra distribuida en las provincias de Jujuy, Salta, Chaco, Catamarca, Tucumán, Santiago del Estero, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, San Juan, San Luis, Mendoza, La Pampa, Buenos Aires, Rio Negro y Chubut

(García *et al.*, 2001). A nivel morfológico, presenta una inflorescencia con espigas tipo racimos con cuatro hileras de espiguillas, cada una de 2,8-3,5 mm de largo. Es una herbácea de raíz profunda, presente en zonas húmedas y más especialmente en los subtrópicos, con lluvias superiores a 900 mm/año (USDA, 2013). Es conocida en Argentina como pasto miel, presenta gran importancia como forrajera, destacándose por su productividad y por la preferencia que el ganado manifiesta por ella (Evers y Burson, 2004).

Otras características que vuelven a *P. dilatatum* un recurso forrajero de interés son la resistencia al pisoteo y al pastoreo cuando dispone de buena fertilidad, la resistencia a sequías y a excesos de agua por su extenso sistema radical, su capacidad de rebrote vigoroso después de períodos de sequías y en respuesta a lluvias. Sin embargo, la difusión de esta forrajera en la siembra se ha visto dificultada por inconvenientes en la producción de semilla, principalmente debido a la susceptibilidad al hongo *Claviceps paspali*, el cual destruye los cariopses reemplazándolos por esclerotos (García *et al.*, 2001).

Por otro lado, *Paspalum notatum* Flüggé también es una gramínea perenne tropical a subtropical. Se distingue por su prominente inflorescencia dual, comúnmente con dos espigas tipo racimos con cuatro hileras de espiguillas. Es nativa de Norteamérica (México), Centroamérica (Belice, Costa Rica, El Salvador, Honduras), el Caribe (Antigua y Barbuda, Dominica, Granada, Martinica, San Cristóbal y Nieves, Santa Lucía, San Vicente y Granadinas, Trinidad y Tobago) y Sudamérica (Guyana Francesa, Guyana, Surinam, Venezuela, Colombia, noreste argentino, Brasil, este de Bolivia, Paraguay, Uruguay). Crece de 0 a 300 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Zuloaga y Morrone, 2005). En Argentina se encuentra distribuido en las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Chaco, Catamarca, Tucumán, Santiago del Estero, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, San Luis, Mendoza, La Pampa y Buenos Aires (Soreng *et al.*, 2003).

Es una gramínea de lento crecimiento, formadora de estolones y gruesos y escamosos rizomas, presenta entrenudos cortos y las raíces forman densas tramas radiculares. Las bases foliares al término de cada rizoma usualmente tienen un matiz purpúreo, presenta un fruto cariopse oval, de 2,5 a 3,5 mm de largo. *P. notatum* se encuentra naturalizado en muchos lugares del mundo, se asocia a suelos arenosos, tolerante de la sombra y sequía. Esta gramínea es valorada por su forma estabilizadora de erosión, facilidad de establecerse y persistencia, además, presenta un mantenimiento relativamente bajo, con pocas enfermedades y problemas de insectos. Dadas sus características de resistencia, es usada como pastura para ganados y como pasto de jardín (Clayton *et al.*, 2006).



Existe evidencia de la presencia de hongos endofitos en algunas especies del género *Paspalum* (Sánchez Márquez *et al.*, 2008). El hongo fitopatógeno *Claviceps paspali* produce azúcares exudados, atrayendo a polillas vectoras de varios fitopatógenos del género *Fusarium*, que suprimirían la acción de *C. paspali*. Además, diversos hongos endofitos encontrados a nivel foliar (*Ampelomyces*, *Curvularia*, *Bipolaris*), aparentemente podrían promover la defensa del huésped contra *C. paspali* (Feldman *et al.*, 2008). Muchos de estos hongos son reconocidos saprófitos que pueden estar en estado latente en la planta y actuar como descomponedores una vez que esta ha muerto, influyendo en el proceso de sucesión ecológica (Lamb y Brown, 1970; Petrini *et al.*, 1995).

García Lemos (2015) y García Lemos *et al.*, (2017) analizaron la presencia de hongos endofitos en plantas forrajeras de *Paspalum dilatatum*, *P. notatum*, *Bromus catharticus*, *B. biebersteinii*, *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum*, en las localidades de Zavalla y Funes, en el sur de la provincia de Santa Fe. Los principales taxos de hongos aislados pertenecieron a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Stemphyllium*. La localidad de Funes presentó la mayor cantidad de cepas fúngicas aisladas. La especie *B. catharticus*, presentó el mayor porcentaje de infección, seguida por la especie *P. dilatatum*, mientras que las muestras colectadas de *F. arundinacea* y *L. multiflorum* no presentaron infección. Se evaluó el efecto antagónico de cepas aisladas del género *Acremonium* frente a cepas fúngicas potencialmente patógenas. Al respecto, *Acremonium sp.* presentó la mayor actividad antagónica mostrando un 91,42 % y 91,35 % de porcentaje de inhibición de crecimiento frente a *Alternaria alternata* y a *Alternaria sp.*, respectivamente. Las pruebas de actividad antimicrobiana mostraron actividad positiva de los extractos fúngicos contra el crecimiento de cepas de *Alternaria*, *Curvularia* y *Fusarium*. Las cepas de *Acremonium spp.* caracterizadas en el estudio, son buenas candidatas para el control biológico de especies patógenas de pasturas. Este fue el primer reporte de especies del género *Acremonium* asociadas a *P. dilatatum* y *P. notatum* en el país. Si bien este fue uno de los primeros estudios de identificación de endofitos en plantas de un agroecosistema y en evaluaciones de antagonismo realizados en Argentina, carece de evaluaciones referidas a la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades *in planta* y mediciones de parámetros agronómicos en plantas infectadas y no infectadas con hongos endofitos, que sí se plantean en este proyecto.

## ORIGEN Y FUNDAMENTO DE LA INVESTIGACIÓN - HIPÓTESIS

Los hongos a menudo alteran la fisiología del hospedante, pero la pérdida de recursos causada por su presencia, puede ser más baja que los beneficios provocados por la protección de los metabolitos bioactivos que estos generan (Jennings y Lysek, 1999) como es el caso de los endofitos.

En el género *Paspalum* existen diversos hongos endofitos encontrados a nivel foliar, que actúan como simbioses en plantas (Feldman *et al.*, 2008). Como hay evidencia de la presencia de estos hongos en algunas especies de *Paspalum* (Sánchez Márquez *et al.*, 2008; García Lemos, 2015; García Lemos *et al.*, 2017), surge la hipótesis 1: **“Existen asociaciones simbióticas de distintas especies de hongos endofitos con especies forrajeras del género *Paspalum*”**. Se desarrollará en el capítulo II de esta tesis.

El control de plagas y enfermedades por medio de procesos biológicos, tales como el uso de microorganismos entomopatógenos o aquellos que inhiben/antagonizan a microorganismos patógenos para las plantas, son una alternativa que puede ayudar a reducir o eliminar el uso de productos químicos en la agricultura (Lacava y Azevedo, 2014). Las plantas con presencia de endofitos, presentan mayor resistencia a diversos ataques de fitopatógenos (Clay *et al.*, 1998; Gamboa *et al.*, 2006; Gundel *et al.*, 2013), conociendo esto se establece la hipótesis 2: **“Los hongos endofitos, actúan como agentes de control biológico contra diversos patógenos fúngicos causantes de enfermedades en especies forrajeras del género *Paspalum*”**. Será evaluado *in vitro* (hipótesis 2, capítulo III) y posteriormente *in vivo* (parte de la hipótesis 4, capítulo IV).

El tratamiento de semillas con temperaturas de 47°C por 21 días (para semillas con menos de 1 año de edad) o 14 días (para semillas más antiguas), puede permitir conseguir plantas de *Paspalum* E- (libres de endofito). Mediante la inoculación con un endofito particular, se pueden obtener plantas E+ (con presencia de endofitos) siguiendo los protocolos aportados por el Prof. Germán Spangenberg (comunicación personal) y lo publicado por Kleczewski *et al.* (2012). De esta manera, con el fin de desarrollar este tipo de plantas para luego realizar estudios comparativos posteriores, surge la hipótesis 3: **“El tratamiento de semillas con humedad y temperatura, permite obtener plantas E- (libres de endofito) y la posterior inoculación genera plantas E+ (infectadas) en *Paspalum*”**. Abordado en el capítulo IV.

En 1998, Clay postuló beneficios para la planta hospedante de endofitos, siendo uno de ellos el aumento en el crecimiento (Bacon y White, 2000; Compant *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009; Patle *et al.*, 2018) planteándose así la hipótesis 4: **“La interacción planta-**

**hongo endofito genera beneficios en el crecimiento aumentando la altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea en gramíneas infectadas sobre las no infectadas y controla determinadas enfermedades en la planta".** Será desarrollada en el capítulo IV de esta tesis.

Los sistemas de pastizales infectados con endofitos deben ser reconocidos en los planes de producción animal y en las prácticas agrícolas, dadas las consecuencias sobre la sostenibilidad de los forrajes y su productividad (Saikkonen *et al.*, 2013). Aunque solo una pequeña fracción (entre 0,1 y 1%, dependiendo del hábitat) de los microorganismos en la naturaleza puede ser cultivada mediante el uso de técnicas microbiológicas convencionales (de Souza Sebastianes *et al.*, 2013), consideramos que los métodos empleados en este estudio proporcionaron información relevante acerca de la composición de la comunidad de hongos endofíticos que colonizan a *P. notatum* y *P. dilatatum*.

Debido a la importancia y utilidad del género *Paspalum* en los ambientes nativos, el cultivo de varias especies a nivel internacional y dado que los endofitos forman con sus hospedantes relaciones simbióticas, nos interesó determinar el funcionamiento de esta simbiosis y establecimos posibles efectos de los hongos endofitos en el control biológico de patógenos generadores de enfermedades y en el crecimiento vegetal.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de hongos endofitos en plantas forrajeras de *Paspalum*, conocer y clasificar la diversidad de los mismos que puedan ofrecer una interacción hongo-hospedante y evaluar el efecto sobre la producción de forraje y sobre patógenos fúngicos causantes de enfermedades.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar taxonómicamente hongos endofitos en *P. notatum* y *P. dilatatum* por medio de técnicas convencionales de aislamiento, cultivo de hongos filamentosos e identificación morfológica y molecular.
2. Evaluación de la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades de *Paspalum*, probando su efecto antagónico contra fitopatógenos mediante pruebas *in vitro*.
3. Puesta a punto de un protocolo a fin de obtener plantas isogénicas de *Paspalum* E- (libres de endofito) y E+ (infectadas) para estudios comparativos posteriores.
4. Medición de parámetros agronómicos en plantas infectadas y no infectadas con el hongo endofito, tales como: altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea; cobertura, características nutritivas y evaluación de control de enfermedades *in planta* como consecuencia de la presencia del hongo endofito.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bacon CW, White J FJ (2000). Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In CW Bacon & JFJ White (Eds.), Boca Raton, FL: CRC Press. Microbial endophytes, 237-263
- Ball D, Lacefield GD, Hoveland CS (1991). The Tall Fescue Endophyte. Agriculture and Natural Resources, paper 33
- Benavente C, Karina M, Lugo M (2008). Micofilas, endofitos fúngicos y alcaloides en poblaciones de *Melica stuckertii* (Poaceae) del Centro de Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 43:3-4
- CIAT (1998). Annual Report Project IP-5. Tropical Grasses and Legumes: Optimizing Genetic Diversity for Multipurpose Use. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia, 5:44-58
- Clay K (1998). Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: Cheplick GP. (Eds.), Population Biology of Grasses, Cambridge University Press, Cambridge. 255-285. USA. 412pp.
- Clay K, Schardl C (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. The American Naturalist, 100:100-127
- Clayton WD, Harman KT, Williamson H (2006). Grass Base - The Online World Grass Flora. URL: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71:4951-4959 <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- de Souza Sebastianes FL, Romão-Dumaresq AS, Lacava PT, Harakava R, Azevedo JL, De Melo IS, Pizzirani-Kleiner AA (2013). Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Current Genetics*, 59(3):153-166 <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0396-8>
- Evers GW, Burson BL (2004). Dallisgrass and other Paspalum species. In LE Moser, BL Burson, LE Sollenberger (Eds.), Madison, WI: ASA, CSSA, SSSA Press. Warm-season (C<sub>4</sub>) grasses, 681-713
- Feldman TS, O'Brien HE, Arnol AE (2008). Moths that Vector a Plant Pathogen Also Transport Endophytic Fungi and Mycoparasitic Antagonists. Microbial Ecology, 56:742-750
- Gamboa M (2006). Hongos Endofitos Tropicales: Conocimiento Actual Y Perspectivas. Acta Biológica Colombiana, 11:3-20
- García M, Arturi MJ, Ansín OE (2001). Potencial de mejora en caracteres cuantitativos de *Paspalum dilatatum* Poir en poblaciones del noreste bonaerense. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata- Argentina, 2:104-105

- García Lemos A (2015). Hongos endofitos presentes en especies forrajeras de la Región Pampeana, evaluación de su potencial como agentes antagonísticos y productores de metabolitos bioactivos. Tesis de Maestría en Recursos Naturales, UNR.
- García Lemos A, Gil-Cardesa ML, Gómez EdV, Felitti SA (2017). Fungal Endophytes in Species of Paspalum and Bromus, Occurrence and In Vitro Antagonistic Activity Assessment. *Research & Reviews: Research Journal of Biology*, 5:11-25
- Gundel PE, Perez LI, Helander M, Saikkonen K (2013). Symbiotically modified organisms: nontoxic fungal endophytes in grasses. TRPLSC-1049, *Trends in Plant Science*, 18:420-427. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.003>
- Jennings DH, Lysek G (1999). *Fungal Biology: Understanding the Fungal Lifestyle* pp.xv 166 pp.
- Kleczewski NM, Bauer JT, Bever JD, Clay K, Reynolds HL (2012). A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal Ecology*, 5(5):521-529. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.006>
- Lacava PT, Azevedo JL (2014). Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. V.C. Verma and A.C. Gange (eds.), *Advances in Endophytic Research*. Springer India, 231-256
- Lamb R, Brown F (1970). Non-Parasitic Microflora on Leaf Surfaces of *Paspalum dilatatum*, *Salix babylonica* And *Eucalyptus stellulata*. *Transactions of the British Mycological Society*, 3:383-390
- Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, White JF Jr, Tadych M (2014). Nomenclatural realignment of Neotyphodium species with genus Epichloë. *Mycologia*, 106, 202–215. <https://doi.org/10.3852/13-251>
- Omacini M, Semmartin M, Pérez LI, Gundel PE (2011). Grass–endophyte symbiosis: A neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology*, 61:273-279. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.012
- Patle P, Phule Krishi Vidyapeeth M, Navnage IN, Krishi Vishwavidyalaya G, Ramteke IP, Navnage N, Ramteke P (2018). Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. 270 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 6(1):270-274
- Petrini O (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. Andrews JH, Hirano SS (eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. Nueva York, USA: Springer-Verlag, 179-197
- Petrini O, Petrini L, Rodrigues K (1995). Xylariaceous endophytes: An Exercise in Biodiversity. *Fitopatologia Brasileira*, 20:531-539
- Rojas C, Galdames R, Romero O (1995). Efecto del Hongo Endofito de la Festuca (*Acremonium coenophialum* Morgan Jones & Gams) sobre la ganancia de peso en novillos a pastoreo. *Agricultura Técnica*, 55:134-139

- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*, 182(2):314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Saikkonen K, Ruokolainen K, Huitu O, Gundel PE, Piltti T, Hamilton CE, Marjo Helander M (2013). Fungal endophytes help prevent weed invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1651-1655.
- Salgado C, Cepero MC (2005). Aislamiento de hongos endofitos en Rosa (*Rosa hybrida*) en Bogota, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22:99-101
- Sánchez Márquez S, Bills GF, Zabalgoceazcoa I (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, 33:87-100
- Soreng RJ, Peterson PN, Davidse G, Judziewicz EJ, Zuloaga FO, Filgueiras TS, Morrone O (2003). *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): IV subfamily Pooideae. Contributions from the United States National Herbarium*. 730pp
- USDA ARS (2013). National Genetic Resources Program. GRIN. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.arsgrin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?26843>
- Zuloaga FO, Morrone O (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. USA. 297pp.

## CAPÍTULO II: DIVERSIDAD ENDOFITA EN PASPALUM

### OBJETIVO ESPECÍFICO 1

**Aislar e identificar taxonómicamente hongos endofitos en *P. notatum* y *P. dilatatum* por medio de técnicas convencionales de aislamiento, cultivo de hongos filamentosos e identificación morfológica y molecular.**

**Depetris, M. B., Acuña, C. A., Gutierrez, S., Marcón, F., & Felitti, S. A. (2020).** Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. **Grass and Forage Science**, 75:316-325. doi: [10.1111/gfs.12494](https://doi.org/10.1111/gfs.12494)

**Depetris, MB; Acuña CA; Gutiérrez S, Felitti, SA. (2018).** Diversidad de Hongos Endofitos en *Paspalum* y su Efecto Sobre el Comportamiento Agronómico de la Planta. Santiago de Chile, Chile. Revista. Resumen. Congreso. **XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018.** Asociación Latinoamericana de Microbiología.

Secuencias registradas como accesiones en DDBJ database (LC425657 a LC425688 y LC605628 a LC605640).



## INTRODUCCIÓN

### LA SIMBIOSIS Y LOS HONGOS ENDOFITOS

A partir de la primera descripción de la simbiosis como “la convivencia de organismos diferentes” (De Bary, 1879), se han definido una serie de estilos de vida simbióticos en función de los beneficios o los impactos en los hospedantes y los simbioses microscópicos (Lewis, 1985). Colectivamente, más de 100 años de investigación sugieren que la mayoría, sino todas, las plantas en ecosistemas naturales son simbióticas con hongos micorrícicos y/o endofitos fúngicos (Petrini, 1986). El registro fósil indica que las plantas se han asociado con hongos endofíticos (Krings *et al.*, 2007) durante más de 400 millones de años y probablemente se asociaron cuando las plantas colonizaron la tierra, por lo que desempeñaron un papel fundamental en impulsar la evolución de la vida en el planeta (Rodríguez *et al.*, 2009).

A diferencia de los hongos micorrícicos que colonizan las raíces de las plantas y crecen en la rizosfera, los endofitos residen completamente dentro de los tejidos vegetales de manera asintomática y pueden crecer dentro de las raíces, tallos y/u hojas, emergiendo para esporular en la senescencia de la planta o del tejido huésped (Stone *et al.*, 2004). En general, se han reconocido previamente dos grupos principales de hongos endofíticos, que reflejan diferencias en la relación evolutiva, taxonomía, hospedantes y funciones ecológicas: los endofitos clavicipitaceos (C), que infectan algunos pastos; y los endofitos no clavicipitaceos (NC), que pueden aislarse de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. Los endofitos NC son hongos muy diversos que representan al menos tres grupos funcionales distintos basados en una serie de características de historia de vida e importancia ecológica. Los endofitos C (endofitos de clase 1) representan un pequeño número de especies clavicipitaceas relacionadas filogenéticamente que son exigentes en cultivo y se limitan a algunos pastos de estación fría y cálida (Bischoff y White, 2005). Estos endofitos forman infecciones intracelulares sistémicas, frecuentemente aumentan la biomasa de las plantas, confieren tolerancia a la sequía y producen químicos que son tóxicos para los animales disminuyendo la herbivoría (Clay, 1988).

Los endofitos NC son muy diversos y representan un ensamblaje de hongos principalmente ascomicetos con roles ecológicos variados y a menudo poco definidos o desconocidos. Se han aislado endofitos NC de cada linaje principal de plantas y de todos los ecosistemas terrestres, incluidos los agroecosistemas y los biomas que van desde los trópicos hasta la tundra (Arnold y Lutzoni, 2007). La escala de su diversidad, sus roles ecológicos, sus posibles aplicaciones y la capacidad de muchos hongos para cambiar entre

estilos de vida endofitos y de vida libre son cada vez más evidentes, generando un entusiasmo creciente por parte de micólogos, ecologistas, fisiólogos y científicos aplicados (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los endofitos NC pueden diferenciarse en tres clases funcionales. Aunque las tres clases tienen amplios rangos de hospedadores, los endofitos de clase 2 pueden crecer tanto en los tejidos por encima como por debajo del suelo. Por el contrario, los endofitos de clases 3 y 4 están restringidos a tejidos aéreos y raíces, respectivamente. La colonización de los tejidos del huésped también difiere: los endofitos de clase 3 forman infecciones altamente localizadas, mientras que los de las clases 2 y 4 son capaces de una colonización tisular extensa. En general, la diversidad de endofitos de clase 2 en plantas hospedantes individuales es bastante limitada (Rodríguez *et al.*, 2008), mientras que la diversidad de la clase 3 dentro de una planta o tejido huésped puede ser extremadamente alta (Arnold *et al.*, 2003). La diversidad de endofitos de clase 4 dentro de plantas individuales no se ha evaluado suficientemente (Rodríguez *et al.*, 2009).

Las diferencias en la biodiversidad de endofitos de clases 2 y 3 pueden reflejar diferencias en los patrones de colonización y transmisión del huésped. Aunque los miembros de ambas clases se transmiten horizontalmente, los endofitos de clase 2 también se transmiten verticalmente a través de capas de semillas, semillas o rizomas. Un aspecto único de la clase 2 es su capacidad de conferir tolerancia al estrés específica del hábitat a las plantas hospedadoras. Los beneficios de aptitud física conferidos por endofitos se definen como adaptados al hábitat si los beneficios son el resultado de presiones selectivas específicas del hábitat, como el pH, la temperatura y la salinidad; o como no adaptado al hábitat si los beneficios son comunes entre los endofitos, independientemente del hábitat. Solo se ha demostrado que los endofitos de clase 2 confieren tolerancia al estrés adaptada al hábitat (Rodríguez *et al.*, 2008).

Estos simbiosntes fúngicos pueden tener profundos efectos sobre la ecología, la forma y la evolución de las plantas, dando forma a las comunidades y manifestando fuertes efectos sobre la estructura y la diversidad de organismos asociados (Omacini *et al.*, 2001).

---

## LA MICROBIOTA ENDOFITA ASOCIADA A PASTURAS

La microbiota endofita asociada a una pastura en particular, usualmente consiste en un número relativamente grande de especies fúngicas y una distribución muy desigual. Se ha indicado que “el número de especies identificadas en un conjunto endofito depende del número de plantas y los lugares analizados”, que existe una correlación positiva entre la

complejidad espacial y la riqueza de especies. Por otro lado, es importante tener en cuenta que las diferencias entre el tamaño de hoja, la estructura anatómica y los componentes químicos entre especies de gramíneas y dentro de la misma planta pueden afectar a la diversidad de los hongos que se encuentran en ellos (Sánchez-Márquez *et al.*, 2012). Debido a que estos simbiontes fúngicos manifiestan efectos sobre la estructura y la diversidad de organismos asociados y modifican las comunidades vegetales (Omacini *et al.*, 2001), se establece la importancia del conocimiento de la diversidad de los endofitos e inspiraron el desarrollo de esta investigación.

Las asociaciones endofitas clavicipitaceas mejor caracterizadas se producen entre gramíneas C<sub>3</sub> y especies del género *Epichloë* (Clay & Schardl 2002), conocido hasta 1998 como *Acremonium* y luego hasta 2014 como *Neotyphodium* [forma asexual de *Epichloë*], (Leuchtman *et al.*, 2014). Estos hongos endofíticos crecen sistémicamente en tejidos de plantas o rizomas sobre la tierra, a menudo se transmiten verticalmente de generación en generación, y pueden mejorar la supervivencia del huésped a través de una serie de mecanismos, incluida la producción de un conjunto de metabolitos secundarios, particularmente alcaloides (Rodríguez *et al.*, 2009). Si bien no se conocen hongos endofíticos clavicipitaceos transmitidos verticalmente en los pastos C<sub>4</sub>, estos pueden beneficiarse de asociaciones con endofitos clavicipitaceos transmitidos horizontalmente, particularmente *Balansia*, *Myriogenospora*, *Parepichloë* o *Echinodopsis*. Por ejemplo, el endofito de transmisión horizontal *Balansia henningsiana*, promovió la producción vegetativa y redujo el daño causado por el hongo que produce manchado de la hoja en *Panicum rigidulum* (Kleczewski *et al.*, 2012). Dado que pocos fueron los estudios realizados sobre diversidad endofita en pastos C<sub>4</sub>, tales como gramíneas del género *Paspalum*, surge el tema principal de esta investigación.

---

## LAS PASTURAS EN ARGENTINA

En Argentina, las especies del género *Paspalum* constituyen la base forrajera de numerosas explotaciones ganaderas. Estas gramíneas, así como otras especies vegetales, establecen simbiosis con hongos que son importantes en la estructura, función y salud de las comunidades de plantas (Sánchez-Márquez *et al.*, 2008). En *Paspalum dilatatum* existen diversos hongos endofitos encontrados a nivel foliar, que actúan como simbiontes en plantas. Dentro de los beneficios para los hospedantes, estas plantas mostraron una mayor resistencia a diversos ataques de fitopatógenos, entre ellos, otros hongos e insectos (Arias *et al.*, 2006). Muchos de estos hongos son reconocidos saprófitos que pueden estar en estado latente en la planta y actuar como descomponedores una vez que la planta ha muerto, influyendo en el proceso de sucesión ecológica (Lamb y Brown, 1970; Petrini *et al.*,

1995). En 1998, Clay postuló otro beneficio para la planta hospedante de endofitos, como el aumento en el crecimiento. Los estudios demuestran claramente que los endofitos causan efectos negativos en los herbívoros (Clay *et al.*, 2002), siendo de aceptación general el postulado de un mutualismo basado en la defensa contra herbivoría (Saikkonen *et al.*, 1998).

El desplazamiento de la ganadería a ambientes menos productivos y a su vez con una distribución de la producción de forraje más estacional, casi sin excepción, llevó a un proceso de sobrecarga de las pasturas y pastizales naturales. La situación actual es de fuertes desbalances entre la escasa oferta y la alta demanda, sólo atenuada en períodos de alto crecimiento de las pasturas y pastizales, es decir, fines de primavera y verano (Bertín, 2009). Además, estas prácticas agrícolas modernas han originado una reducción de la biodiversidad, conduciendo a un ecosistema artificial que requiere constante intervención humana por medio de aporte de agroquímicos, que además del incremento temporal de las producciones, originan costos sociales y medioambientales indeseables. Las pérdidas de producción debido a plagas y enfermedades, se cifran en alrededor del 20 al 30% para la mayoría de cultivos. El pensamiento de una agricultura sostenible buscaría reducir al mínimo el uso de pesticidas y fertilizantes que perjudican el medio ambiente y la salud de los agricultores y consumidores (Altieri y Nicholls, 1999).

La conservación de una variedad de especies de forrajes, ya sean gramíneas como leguminosas, en las regiones donde se cultivan las forrajeras, combinado con el posible uso de nuevas biotecnologías que fomenten en la planta una resistencia positiva ante el estrés biótico y abiótico, como es el caso de los endofitos, constituyen herramientas fundamentales para resolver parte de los problemas planteados como los desbalances estacionales e interanuales, el déficit de forraje por estrés hídrico y el ataque de diversas plagas (Bertín, 2009).

---

## FACTORES MODIFICADORES DE LA DIVERSIDAD ENDOFITA

Los hongos endofíticos son un componente importante, pero en gran parte inexplorado, de la diversidad fúngica global, especialmente los que se encuentran en las hojas de especies tropicales y se supone que son hiperdiversos (Arnold *et al.*, 2000). Dado que los beneficios conferidos por estos hongos parecen depender de la especie huésped, el genotipo del huésped y las condiciones ambientales (Faeth *et al.*, 2006), se propuso estudiar la diversidad endofita en diferentes situaciones para contribuir al mejor conocimiento de los funcionamientos simbióticos en los agroecosistemas en especies forrajeras del género *Paspalum*.

A pesar de la hipótesis general de un gradiente latitudinal o climático en la diversidad biológica (Hillebrand, 2004), sólo un número limitado de estudios ha comparado la diversidad fúngica entre diferentes regiones climáticas (Opik *et al.*, 2006; Amend *et al.*, 2010; Tedersoo y Nara, 2010; Osono, 2011). Por ejemplo, Arnold y Lutzoni (2007) publicaron uno de los pocos informes de aumentos en la incidencia y la diversidad a nivel de especies de hongos endofíticos asociados con las hojas de los árboles con latitudes decrecientes en América del Norte. Por otro lado, otros autores plantean una hipótesis consistente, donde la diversidad de hongos endofíticos en una familia de hongos en particular, sería mayor en las regiones más cálidas a lo largo de los gradientes climáticos asiáticos y que la composición taxonómica y la recurrencia del huésped de hongos endofíticos serían diferentes entre las regiones climáticas (Ikeda *et al.*, 2014). Para probar la existencia de un gradiente latitudinal o climático de diversidad endofita en *Paspalum*, se seleccionó como sitios de muestreo a Riachuelo, Corrientes (S27°38'15"; O58°44'48") con menor latitud y Zavalla, Santa Fe (S33°01'56"; O60°54'16") con mayor latitud.

Ghimire *et al.*, (2011), realizaron un estudio para explorar comunidades de endofitos fúngicos que habitan en plantas nativas de *Panicum virgatum* L., en praderas del norte de Oklahoma. Evaluaron la diversidad en muestras de plantas en las primeras etapas vegetativas, reproductivas y de senescencia. El número total de aislamientos de hongos obtenidos de los tejidos en crecimiento aumentó de manera constante de abril a julio y disminuyó drásticamente en la colección de octubre. Una posibilidad para esta diferencia puede ser que los tejidos foliares de las plantas de pasto senescente o pre-senescente tienen un contenido de nutrientes sustancialmente menor (Yang *et al.*, 2009), lo que podría ser menos adecuado para el crecimiento endofítico. Además, la disminución de la temperatura ambiente hacia el final de la temporada de crecimiento podría tener un impacto negativo en el mismo y/o en el mantenimiento de varios hongos endofíticos en los tejidos foliares. Dado que la variación de las comunidades endofíticas en diferentes estadios fenológicos de los pastos ha sido muy poco estudiada, se planteó analizar la diversidad endofita en estado vegetativo y reproductivo en *Paspalum*.

De esta manera, por todo lo previamente mencionado, se planteó el Objetivo 1: "Aislar e identificar taxonómicamente hongos endofitos en *P. notatum* y *P. dilatatum* por medio de técnicas convencionales de aislamiento, cultivo de hongos filamentosos e identificación morfológica y molecular".

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SITIO DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

Se utilizaron para este experimento 2 especies vegetales, *Paspalum notatum* y *P. dilatatum* ya que son las especies del género *Paspalum* más utilizadas como forraje (Acuña *et al.*, 2019). Los sitios de muestreo consistieron en dos pastizales naturales expuestos al pastoreo extensivo ya que representan los sistemas típicos de producción de ganado vacuno en Argentina (Depetris *et al.*, 2020).

Se recogieron muestras de plantas de *P. notatum* en Riachuelo, Corrientes, Argentina (S27°38'15"; O58°44'48"). Riachuelo es una localidad y municipio en el extremo noroeste de la provincia de Corrientes, a orillas del río Paraná y a 12 kilómetros al sur de la Ciudad de Corrientes, siendo parte del centro de diversidad de la especie. Tiene un clima subtropical húmedo con una temperatura media anual de 22°C y un régimen de precipitaciones medio anual de 1300 mm (Carnevalli, 1994). El tipo de suelo es clasificado como Argiudol acuico, con pendiente entre 1 y 1,5% (Escobar *et al.*, 1996).

*Paspalum dilatatum* fue colectado en un pastizal que corresponde al lote 18 de cría, Facultad de Ciencias Agrarias, Zavalla, Santa Fe (S 33°01'56"; O 60°54'16"). Zavalla es una localidad del departamento Rosario, provincia de Santa Fe. Al este limita con la vecina localidad de Pérez y al oeste con Pujato. Pertenece a un territorio donde *P. dilatatum* crece naturalmente y conforma la base de muchos sistemas pastoriles. Por otro lado, Zavalla tiene un clima templado cálido y húmedo, con una temperatura media anual de 17°C y precipitaciones medias anuales de 985 mm (Sacchi *et al.*, 2000). El suelo es un Natracuol típico.

Los sitios de recolección fueron distantes ya que *P. notatum* es más común en climas cálidos y *P. dilatatum* crece naturalmente en áreas templadas de América del Sur. El momento de recolección de las plantas fue a la salida del invierno, correspondiente a los meses de Septiembre – Noviembre 2016. No se utilizaron fertilizantes en ninguno de los sitios de recolección y el momento de recolección de muestras fue en un período normal en términos hídricos, no se registraron periodos de sequía (Depetris *et al.*, 2020).

En cada ubicación, se tomó la muestra vegetal con un macollo enraizado dejando una distancia de cada 10 m entre muestras, a través de la pastura natural. Se colectaron plantas sin síntomas observables de enfermedades, las cuales luego fueron transportadas en bolsas de polietileno, se lavaron con agua corriente (de Souza Sebastianes *et al.*, 2013) y se colocaron en macetas rotuladas.



**Figura 1.** Recolección de plantas de *Paspalum dilatatum*, lote 18 de cría, localizada en el Campo experimental “J. F. Villarino”, Zavalla, Santa Fe.

Se definieron 3 tipos de muestreos con diferentes condiciones para la evaluación de la diversidad de endofitos. La primera (1) consistió en dos especies de *Paspalum* cada una en distintas regiones climáticas dado que crecen en ambientes distintos (subtropical = *P. notatum*, Riachuelo / templado = *P. dilatatum*, Zavalla) (Depetris *et al.*, 2020). La segunda (2) evaluó la diversidad teniendo en cuenta dos momentos fenológicos (Vegetativo y Reproductivo (Floración)). Por último (3), en la zona subtropical de Riachuelo, *P. notatum* fue colectado en tres subzonas con diferente vegetación arbórea (Ecosistemas). Estos fueron: pradera (A), sabana dominada por Timbó (B) y sabana de Quebracho colorado (C).

Ver detalle de apartados 1, 2 y 3 en la tabla siguiente.

**Tabla 1:** Cantidades de las plantas analizadas en cada situación evaluada.

Por especie y región climática (1).	Total plantas	Por momento fenológico (2).	Total de plantas	Por vegetación (3).	Total de plantas
<i>P. notatum</i> , Riachuelo, Subtropical	84	Vegetativo	60	A	20
				B	20
				C	20
		Reproductivo	24	A	8
				B	8
				C	8
<i>P. dilatatum</i> , Zavalla, Templada	60	Vegetativo	37		
		Reproductivo	23		



---

## AISLAMIENTO DEL HONGO ENDOFITO

Para el aislamiento de hongos a partir de las plantas colectadas se realizó un proceso de triple esterilización sumergiendo porciones pequeñas (1-3 cm) de hojas y tallos en alcohol e hipoclorito de sodio para eliminar colonizadores superficiales. El proceso de triple esterilización utilizado consistió en:

1º Alcohol (90% v/v) 1 *minuto*

2º Hipoclorito de sodio (50% m/v) 9 *minutos*

3º Alcohol (70% v/v) 1 *minuto*

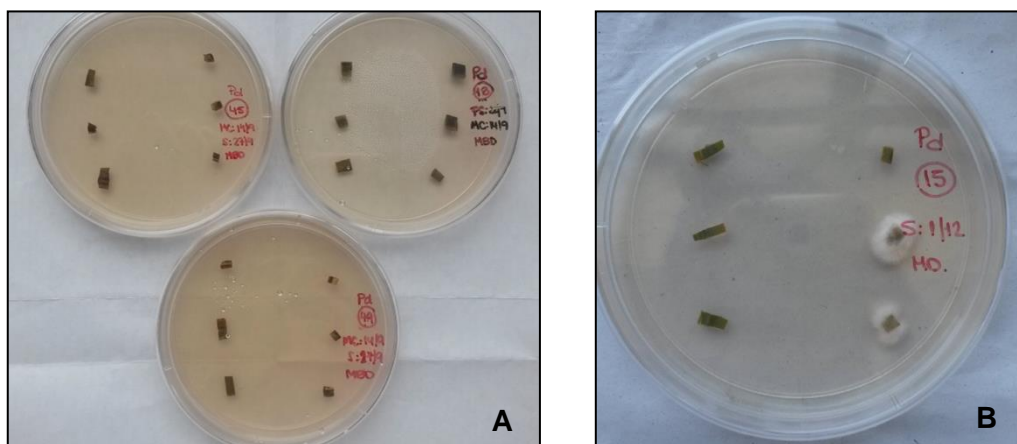
4º Tres enjuagues con agua destilada secado sobre papel filtro estéril.

Se realizaron cortes de 3-5 mm de las muestras esterilizadas y se sembraron 6 porciones de hojas y tallos en placas de Petri con medio PDA (Agar-Papa-Dextrosa) con antibiótico (cloranfenicol 500 mg/l) y/o sulfato de estreptomina (40 mg/ml), para controlar crecimiento bacteriano (Figura 2). Todo el material se incubó a 28°C en oscuridad durante 30 días (Craven *et al.*, 2001).

Para evaluar la calidad del proceso de desinfección, 100 µl del agua del enjuague de los tejidos previo a la siembra en placa, fueron sembrados en medio PDA, e incubados a 28°C durante 15 días. La ausencia de crecimiento microbiano indicó que la superficie del tejido se ha desinfectado correctamente, validando al aislamiento como fiable (de Souza Sebastianes *et al.*, 2013).

Además, se controlaron los cultivos regularmente para eliminar hongos oportunistas cuyo crecimiento es más rápido que el de los hongos endofitos. La purificación de las cepas fúngicas se llevó a cabo tomando porciones de 5 mm de la colonia del hongo y las que se sembraron individualmente en placas de Petri con medio PDA. El mantenimiento de los hongos puros fue mediante nuevos aislamientos cada cinco - seis meses en tubos de ensayo, conservando el material crecido a 4°C. Todos los procesos fueron realizados en cámara de flujo laminar.





**Figura 2. A.** Siembra de explantos de tallo y hoja de *Paspalum* en medio PDA; **B.** Colonias del hongo endofito *Acremonium* sp. creciendo a partir de explantos luego de 9 días de cultivo.

---

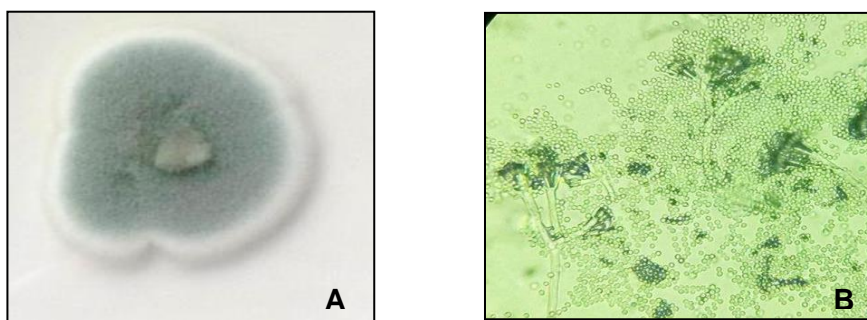
## IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE HONGOS ENDOFITOS

---

### CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Obtenidos los cultivos puros de cada cepa, procedimos a tomar datos de diámetro, color, reverso, margen, textura y registros fotográficos de las colonias (Figura 3 A). Posteriormente, realizamos la observación microscópica de los hongos aislados, por medio de montajes de las colonias sobre láminas portaobjetos visualizables a través del microscopio (Figura 3 B). Utilizamos una gota de azul de algodón para estructuras hialinas y de lactofenol para estructuras oscuras (Craven *et al.*, 2001).

Se registró la forma y tamaño de esporas, hifas, conidios, presencia y/o ausencia de septos, entre otras estructuras de hongos filamentosos. Los hongos aislados se identificaron siguiendo claves taxonómicas (Nelson *et al.*, 1983; Watanabe, 2002; Novicki *et al.*, 2003; Chaverri *et al.*, 2011; Manamgoda *et al.*, 2012; 2014; Bensch *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2013; Woudenberg *et al.*, 2013; 2015; Samson *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2014; Braun *et al.*, 2015). La presencia de un hongo endofito se registró como positiva si fue detectado en al menos una muestra o segmento de órgano vegetal.



**Figura 3. A.** Cultivo puro de endofito fúngico. **B.** Observación de estructuras microscópicas fúngicas a 40x de aumento.

---

### CLASIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio seco (60-75 mg) de aislamientos de cultivos puros crecidos en medio líquido. El medio utilizado fue M102 alternativo y para su preparación se utilizaron 5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 20 g de sacarosa y agua destilada para alcanzar 1000 ml de medio líquido (Bacon y White, 1994). En tubos falcon de 15 ml, se colocaron 10 ml del medio líquido y fueron autoclavados. Luego, se sembró una porción de micelio de los cultivos puros. Las muestras fueron incubadas durante 15 días a 28°C en agitación en un agitador Orbital (Depetris *et al.*, 2020). Finalmente, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet (micelio) se dejó secar y luego se molió en un mortero con nitrógeno líquido. A continuación, los micelios se desagregaron en dos incubaciones consecutivas, se trataron las muestras con ARNasas y se chequearon las concentraciones en geles de agarosa, siguiendo el protocolo reportado por Möller *et al.* (1992) and Allen *et al.* (2006). Brevemente, se amplificaron las secuencias de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) con cebadores específicos (ITS1 y ITS4) utilizando el ADN genómico extraído como molde (White *et al.*, 1990; James *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2012). Fue chequeado el tamaño de las bandas obtenidas en geles de agarosa (1% m/v en TBE 0,5X) teñidos con SYBR SAFE (Invitrogen), sembrando un marcador de peso molecular (100 bp Quick-load, New England Biolabs). Las amplificaciones obtenidas fueron secuenciadas por Macrogen Inc. (Corea) y analizadas con el programa Sequencher versión 4.1.4 (demo). Las correspondientes a los cebadores específicos fueron detectadas y eliminadas. La longitud de las resultantes varió entre 500-600 pb como es esperada para esa combinación de cebadores (Accesiones en DDBJ [DNA Data Bank of Japan]: LC425657 a LC425688 y LC605628 a LC605640) (Depetris *et al.*, 2020).

Además, se llevó a cabo una búsqueda de secuencias ITS de géneros y especies fúngicas conocidas en la base de datos del *Centro Nacional para la Información Biotecnológica* o *National Center for Biotechnology Information* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las búsquedas fueron confinadas a las especies de hongos indagando en las siguientes bases de datos: Nucleotide (Depetris *et al.*, 2020). Finalmente, todas se analizaron utilizando el software Phylogeny dando como resultado un árbol filogenético (Dereeper *et al.*, 2008). Estas secuencias utilizadas como modelo permiten determinar en el dendrograma la cercanía con las secuencias encontradas en este estudio y confirmar o descartar las clasificaciones morfológicas a nivel de género e incluso, en algunos casos, alcanzar nivel de especie fúngica. Los endofitos fúngicos que no esporularon, fueron clasificados como 'Desconocidos o No Identificados'.

---

## ANÁLISIS DE DATOS

Se registró el número de géneros de hongos endofitos aislados y se calcularon parámetros básicos como el porcentaje de infección endofita (plantas E+) y de ocurrencia por género. Estos valores se utilizaron para realizar diferentes comparaciones entre:

- 1) diferentes especies de *Paspalum* y regiones climáticas (subtropical = *P. notatum*, Riachuelo; templado = *P. dilatatum*, Zavalla).
- 2) momentos fenológicos para ambas especies: vegetativo y reproductivo (Floración).
- 3) Subzonas / ecosistemas con diferente vegetación arbórea.

Los parámetros de comparación fueron determinados de la siguiente manera (García Lemos, 2015):

- Porcentaje de infección endofita =  $(N^{\circ} \text{ de plantas infectadas [E+]} / N^{\circ} \text{ total de plantas}) * 100$ .
- Porcentaje de ocurrencia<sup>1</sup> del género =  $(N^{\circ} \text{ de aislamientos del género} / N^{\circ} \text{ total de plantas}) * 100$ .

<sup>1</sup> Incidencia o frecuencia.

- Diversidad de géneros endofitos =  $N^{\circ} \text{ géneros endofitos distintos}$ .

Dado que existieron variaciones en el número de plantas analizadas en las diferentes situaciones (por especie vegetal y región templada/subtropical, momento fenológico y subzona de exposición a la luz/temperatura), se decidió trabajar con los porcentajes de infección y ocurrencia para cada situación analizada.

## RESULTADOS

### ESPECIES FÚNGICAS AISLADAS DE LAS GRAMÍNEAS ESTUDIADAS

Obtuvimos 66 aislamientos fúngicos en un total de 144 plantas analizadas. En *P. dilatatum*, se evaluaron 60 plantas (37 en vegetativo y 23 en reproductivo), y se consiguieron 22 aislamientos y 22 plantas E+. En *P. notatum*, se analizaron 84 plantas (60 en vegetativo y 24 en reproductivo), y se aislaron 44 hongos endofitos y 39 plantas infectadas (E+). Se clasificó a un total de 83 plantas como *sin endofito* por no lograrse aislamientos fúngicos.

**Tabla 2.** Total de plantas analizadas, aislamientos y porcentajes por especie / zona.

Especie / Zona	Plantas analizadas	Total aislamientos	%	Plantas E+	% E+
<i>Paspalum dilatatum</i> - Zona templada	60	22	37%	22	36,67
<i>Paspalum notatum</i> - Zona subtropical	84	44	52%	39	46,43
Total	144	66	46%	61	42,36

De los 66 aislamientos, se hicieron evaluaciones morfológicas y extracciones de ADN, amplificaciones y secuenciaciones para los análisis de identificación molecular. Veintidós cepas no lograron ser identificadas por el análisis de las características morfológicas ni por estudios moleculares. Dentro de este número encontramos endofitos no esporulantes, micelio estériles, de mala calidad de extracción o secuenciación de ADN o con secuencias menores de 50 pb. Fueron clasificados como desconocidos y no fueron utilizados en los análisis por especies y clima, momento fenológico, diferencias en temperatura y luz.

Se lograron identificar 44 aislamientos y se clasificaron en 10 géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Para esto, basándonos en la clasificación morfológica, se llevó a cabo una búsqueda de secuencias ITS de géneros y especies fúngicas conocidas. Utilizamos la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica o *National Center for Biotechnology Information* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las búsquedas fueron confinadas a las especies de hongos indagando en la base de datos Nucleotide. Finalmente, todas se analizaron utilizando el software *Phylogeny* (Dereeper *et al.*, 2008). Estas secuencias utilizadas como modelo permiten determinar en el dendrograma la cercanía con las secuencias encontradas en este estudio y confirmar o descartar las

clasificaciones morfológicas a nivel de género e incluso, en algunos casos, alcanzar nivel de especie fúngica. En el caso de algunos pocos aislamientos que no esporularon, su clasificación se basó sólo en su secuencia ITS. Para esto, se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, del sitio NCBI) con cada secuencia, para aproximar su determinación y luego fueron analizadas con software *Phylogeny*.

**Tabla 3.** Total de aislamientos y porcentaje de ocurrencia por género hallado.

<b>Géneros Endofitos</b>	<b>Total de aislamientos</b>	<b>% de Ocurrencia</b>
<i>Acremonium</i>	4	2,78
<i>Alternaria</i>	5	3,47
<i>Aspergillus</i>	6	4,17
<i>Bipolaris</i>	8	<b>5,56</b>
<i>Cladosporium</i>	1	0,69
<i>Fusarium</i>	2	1,39
<i>Penicillium</i>	3	2,08
<i>Trichoderma</i>	4	2,78
<i>Curvularia</i>	8	<b>5,56</b>
<i>Cercospora</i>	3	2,08
No identificados	22	15,28
Total identificados	44	

Los mayores valores de porcentaje de ocurrencia de los géneros en el total de plantas analizadas corresponden a *Bipolaris* y *Curvularia*.

---

## GÉNEROS DE HONGOS ENDOFITOS AISLADOS

A partir del análisis de las especies de gramíneas muestreadas en cada región climática, subzona de exposición a la luz/temperatura y momento fenológico, se desarrolló la siguiente tabla a fin de ordenar de manera simplificada los resultados obtenidos en las diferentes situaciones analizadas.

**Tabla 4:** Géneros endofitos obtenidos en las diferentes situaciones analizadas.

Momento	Nº Aisl. / planta	Nº/sp	Especie Vegetal	Zona de Muestreo	Nº Aisl.	Géneros
F	1	1	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Acremonium</i>
V	2	2	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Fusarium</i>
V	3	3	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Alternaria</i>
F	4	4	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	5	5	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Aspergillus</i>
F	6	6	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	7	7	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	8	8	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	No Identificado
F	9	9	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	10	10	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Acremonium</i>
F	11	11	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Alternaria</i>
F	12	12	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	13	13	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	14	14	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	15	15	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Acremonium</i>
V	16	16	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Acremonium</i>
F	17	17	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	18	18	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	19	19	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	20	20	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	21	21	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	22	22	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	23	23	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	24	24	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	25	25	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	26	26	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Fusarium</i>

F	27	27	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	28	28	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	29	29	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	30	30	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Cladosporium</i>
F	31	31	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
F	32	32	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	33	33	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	34	34	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	No Identificado
V	35	35	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	No Identificado
V	36	36	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Alternaria</i>
V	37	37	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	No Identificado
V	38	38	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	39	39	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	No Identificado
V	40	40	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	41	41	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	42	42	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Bipolaris</i>
V	43	43	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	44	44	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Bipolaris</i>
V	45	45	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	46	46	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	47	47	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	48	48	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	49	49	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	50	50	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	51	51	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	52	52	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	53	53	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	54	54	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	55	55	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	56	56	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	No Identificado



V	57	57	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	0	/
V	58	58	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Alternaria</i>
V	59	59	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Bipolaris</i>
V	60	60	<i>Paspalum dilatatum</i>	Zavalla, Cría	1	<i>Bipolaris</i>
V	61	1	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Aspergillus</i>
V	62	2	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Bipolaris</i>
V	63	3	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Bipolaris</i>
V	64	4	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Trichoderma</i>
V	65	5	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Bipolaris</i>
V	66	6	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	No Identificado
V	67	7	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	No Identificado
V	68	8	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Penicillium</i>
V	69	9	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	70	10	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Penicillium</i>
V	71	11	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Bipolaris</i>
V	72	12	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	73	13	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Trichoderma</i>
V	74	14	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	75	15	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	76	16	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	77	17	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	78	18	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	79	19	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	80	20	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
V	81	21	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	<i>Aspergillus</i>
V	82	22	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	83	23	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	84	24	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	85	25	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	86	26	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/



V	87	27	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	88	28	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	No Identificado
V	89	29	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	90	30	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	No Identificado
V	91	31	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	92	32	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	No Identificado
V	93	33	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	94	34	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	95	35	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	96	36	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	97	37	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	98	38	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	No Identificado
V	99	39	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
V	100	40	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	Aspergillus
V	101	41	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	102	42	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	103	43	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	104	44	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	No Identificado
V	105	45	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	106	46	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	107	47	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	108	48	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	109	49	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	110	50	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	Penicillium
V	111	51	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	Aspergillus
V	112	52	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	Trichoderma
V	113	53	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	114	54	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	No Identificado
V	115	55	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	116	56	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/

V	117	57	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	118	58	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
V	119	59	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	<i>Aspergillus</i>
V	120	60	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	<i>Trichoderma</i>
F	121	1	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
F	122a 122b	2	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	2	<i>Curvularia</i> <i>Curvularia</i>
F	123	3	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
F	124	4	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
F	125	5	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
F	126	6	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	0	/
F	127	7	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>Curvularia</i>
F	128	8	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Normal)	1	<i>No Identificado</i>
F	129	1	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	<i>Curvularia</i>
F	130	2	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	<i>Curvularia</i>
F	131	3	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	<i>Cercospora</i>
F	132	4	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	<i>No Identificado</i>
F	133	5	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	1	<i>No Identificado</i>
F	134	6	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
F	135a 135b	7	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	2	<i>No Identificado</i> <i>No identificado</i>
F	136	8	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Timbó)	0	/
F	137	1	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/
F	138a 138b	2	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	2	<i>No Identificado</i> <i>Cercospora</i>
F	139a 139b	3	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	2	<i>Curvularia</i> <i>Curvularia</i>
F	140	4	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	<i>Curvularia</i>
F	141a 141b	5	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	2	<i>Cercospora</i> <i>Alternaria</i>
F	142	6	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	0	/

F	143	7	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	No Identificado
F	144	8	<i>Paspalum notatum</i>	Riachuelo (Quebrachal)	1	No Identificado

Momento = V (vegetativo); R (Reproductivo). N° Aisl. / planta = número de planta analizada con el que se nombra al aislamiento proveniente de la misma. N°/sp = número de planta analizada por especie vegetal. Zona de Muestreo = Zavalla (Cría) / Riachuelo pradera (A), sabana con presencia de Timbó (B) y sabana con presencia de Quebracho colorado (C). N° Aisl. = número de aislados en cada planta analizada. Géneros = géneros aislados.

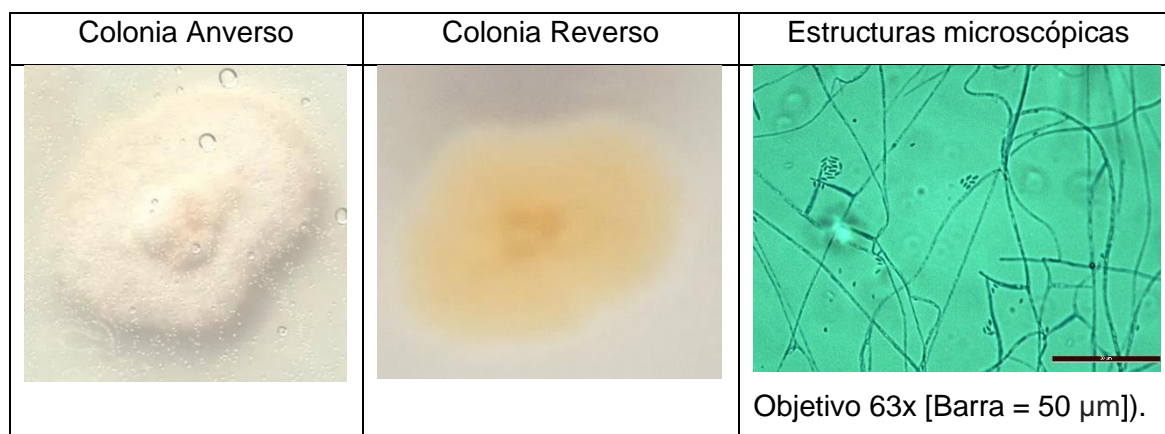
Las especies endofitas identificadas se transmiten horizontalmente, formando infecciones locales (Saikkonen *et al.*, 1998; Zabalgoageazcoa *et al.*, 2013) y no se detectó ningún miembro Clavicipitaceae en las especies de *Paspalum* analizadas. Estos hongos aislados, pertenecen al reino Fungi, phylum Ascomycota. A continuación, se describen los géneros y familias de los aislamientos hallados (Depetris *et al.*, 2020).

## CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES DE HONGOS ENDOFITOS AISLADOS

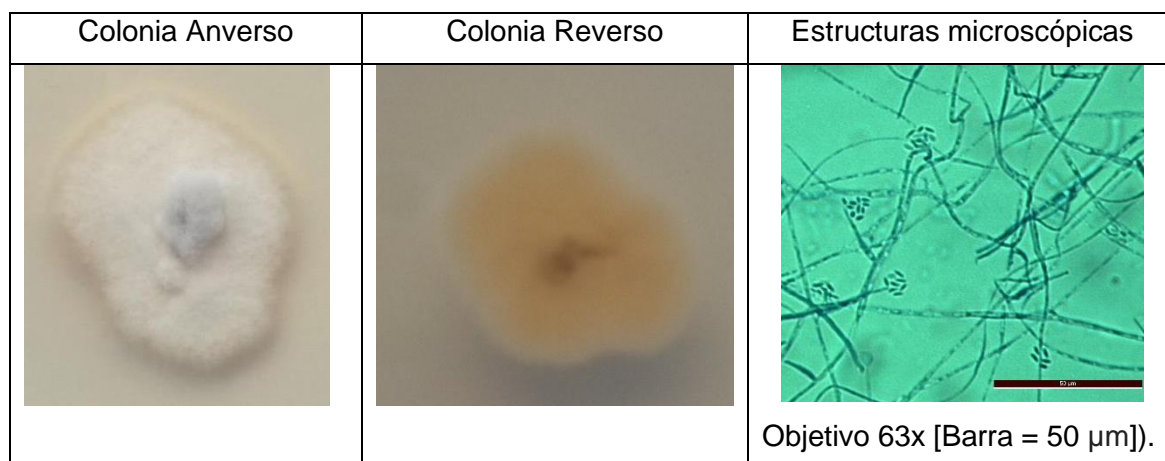
**Género: *Acremonium***, Orden Sordariomycetes, Familia: Hypocreomycetidae, *Incertae sedis*.

Son hongos de lento crecimiento *in vitro*, desarrollando micelio aéreo algodonoso o aterciopelado que en ocasiones tiende a verse muy húmedo, con coloración blanquecina a rosa pálido y naranja. Al anverso, las coloraciones van desde rosa, pardo, ocre y tiende a oscurecerse en los cultivos más viejos (Summerbell *et al.*, 2011). Hifas septadas, con fiálides delgadas producidas en grupos o individuales. Conidióforos perpendiculares a las hifas, con conidios unicelulares, ovalados, hialinos, agrupados en cabezas mucoides (Novicki *et al.*, 2003).

- *Acremonium* sp. 1: Aislamiento 1. Clasificado morfológica y molecularmente.



- *Acremonium strictum* (W. Gams) (nueva clasificación: *Sarocladium strictum*). Aislamientos 10, 15 y 16. Clasificado morfológica y molecularmente.



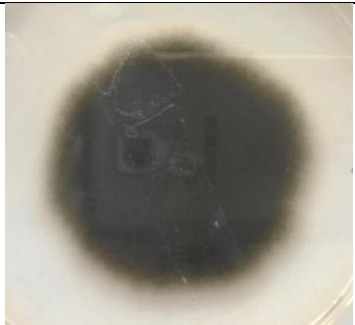
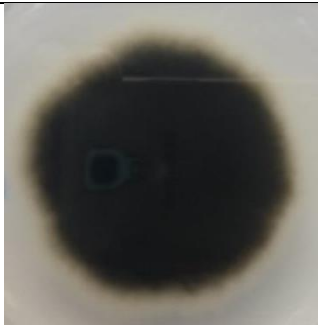

**Características culturales:** Colonias alcanzando 2,5 cm de diámetro en 10 días y a 30°C, en medio agar PDA, de aspecto húmedo, color blanco rosadas, con un reverso incoloro (Novicki *et al.*, 2003).

**Características microscópicas:** Conidios unicelulares, cilíndricos, lisos, hialinos a ligeramente rosados y agrupados en cabezas viscosas. Los conidióforos con fiálides simples, delgados y erectos con tabiques basales que surgen de las hifas vegetativas, a veces de hifas aéreas fasciculadas (Novicki *et al.*, 2003).



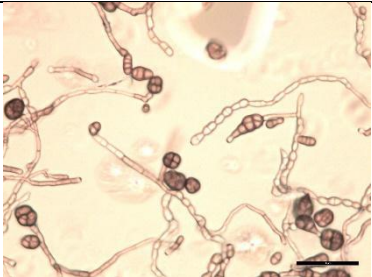
**Género:** *Alternaria*, Clase: Dothideomycetes, Orden: Pleosporales, Familia: Pleosporaceae

Colonias de color gris verdoso, o castaño oscuro, con micelio sumergido en el medio o superficial, hifas hialinas, luego oliváceas, castañas. Conidióforos macronematosos, mononematosos, simples o irregulares y poco ramificados, de color castaño claro, solitarios o en fascículos, con conidios con septos transversales y longitudinales (dictiosporas), de color castaño claro a castaño oscuro, originados por el brote apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote (Woudenberg *et al.*, 2013; 2015).

- *Alternaria* sp. 1: Aislamiento 11. Clasificado morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 Objetivo 63x [Barra = 50 µm].

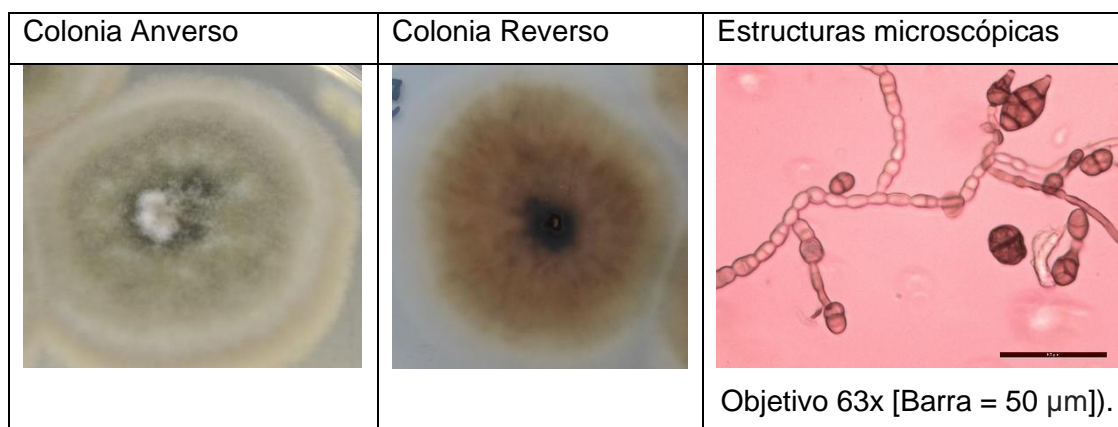
- *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl: Aislamientos 36 y 141b. Clasificados morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 Objetivo 40x [Barra = 50 µm].

**Características culturales:** En medio PDA las colonias son gris oscuro, con crecimiento en forma de anillos concéntricos y esporulación abundante a los 6 días de incubación. De aspecto algodonoso, chatas, oscureciéndose con el tiempo adquiriendo coloraciones que van del castaño al negro, usualmente tienen un margen blanco prominente (2 a 5 mm). Reverso de color negro a grisáceo (Pryor y Michailides, 2002).

**Características microscópicas:** Conidióforos simples, tabicados, de color castaño; conidios ovados, castaño, con septos transversales y verticales de disposición irregular; generación de nuevos conidios por germinación de la célula apical, formándose largas cadenas de 6 a 14 conidios (Woudernberg *et al.*, 2013; 2015).

- *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire: Aislamientos 3 y 58. Clasificados morfológica y molecularmente.



**Características culturales:** Colonias de color gris oliva pálido a gris oliva, a menudo con un margen blanco muy delgado (1 a 2 mm). La textura es generalmente de lanosa a algodonosa. Alcanzan de 50 a 70 mm de diámetro después de 7 a 10 días a 30° C (Pryor y Michailides, 2002).

**Características microscópicas:** Cadenas rectas, relativamente largas de 6 a 18 conidios de longitud sobre cortos conidióforos y aparición infrecuente de cadenas secundarias de 1 a 4 conidios de longitud. Crecimiento lateral de conidióforos secundarios de las células conidiales medianas o basales y la formación subsiguiente de conidios, típicamente de forma ovada a obclavada. Muchos conidios desarrollan extensiones apicales distintivas (Woudenberg *et al.*, 2013, 2015).

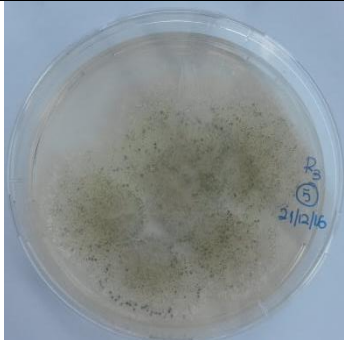

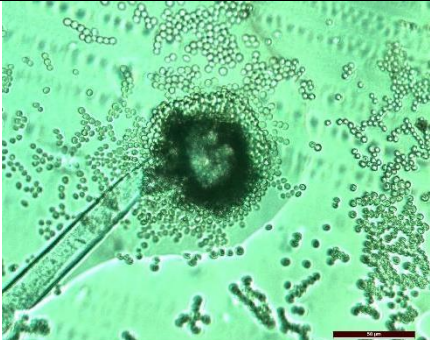
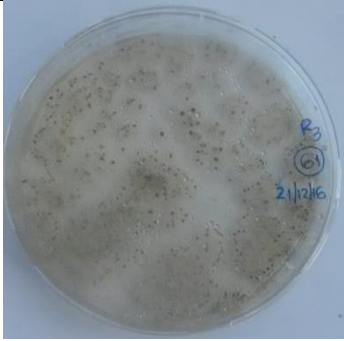
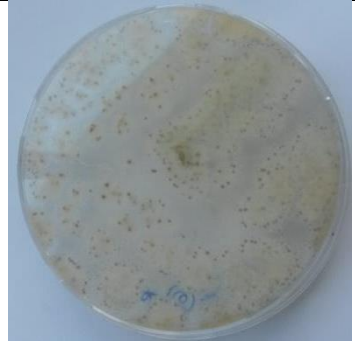

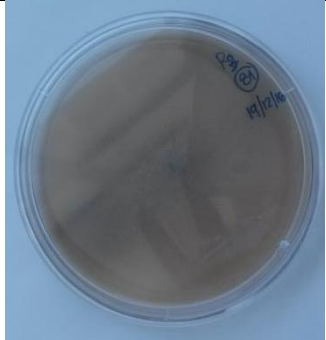

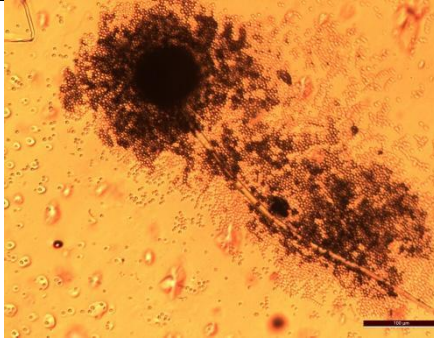
---

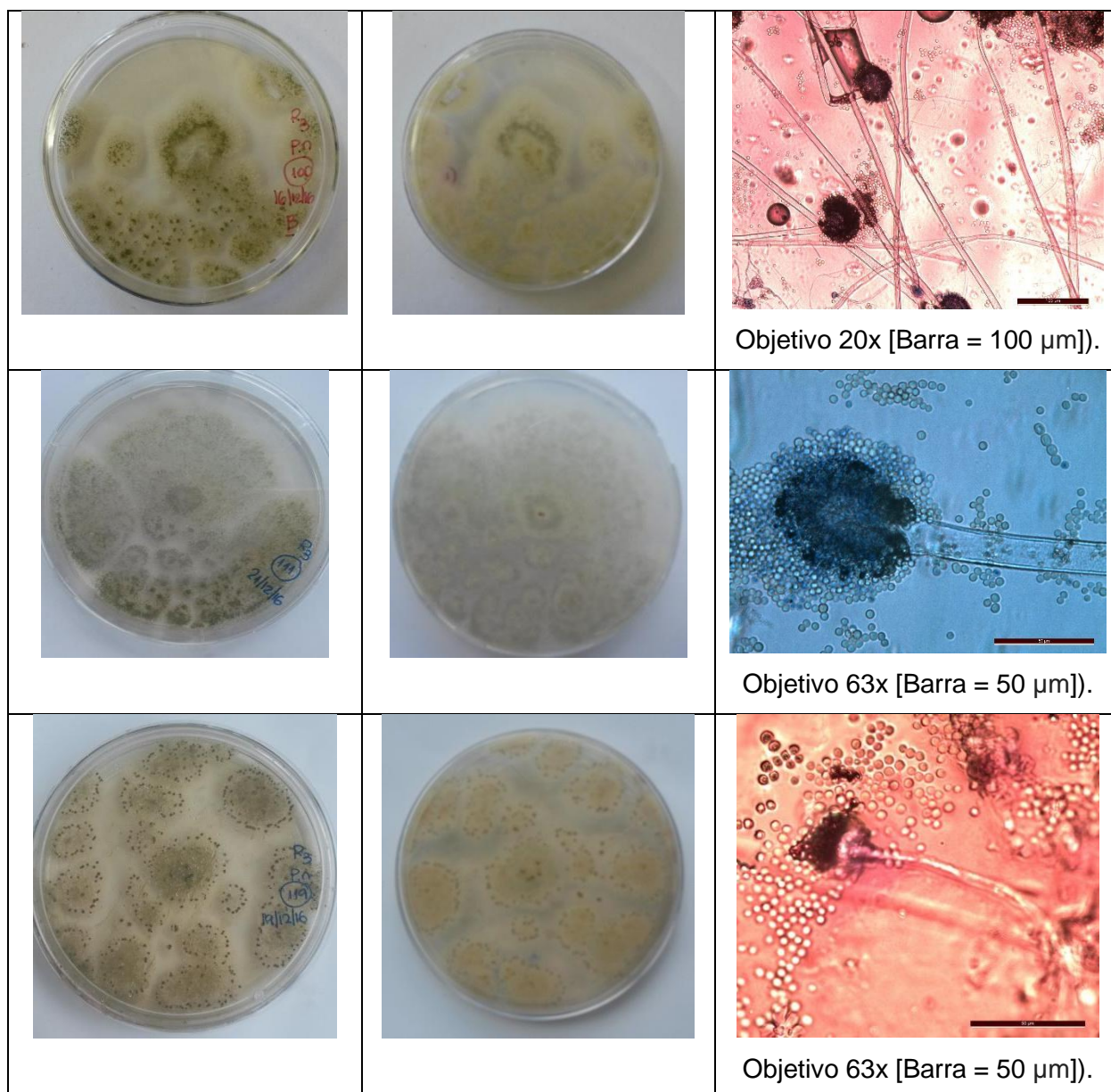
**Género:** *Aspergillus*, Clase: Eurotiomycetes, Orden: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae

Colonias efusas de diversos colores (verde o amarillento, a veces castaños o negros), con micelio de aspecto polvoriento, de rápido crecimiento, sumergido una parte y superficial. Conidióforos macronematosos, mononematosos, rectos o flexuosos, incoloros o con la parte superior de color marrón oscuro, generalmente suave, hinchada en el ápice en una vesícula esférica cuya superficie está cubierta por ramas cortas o en algunas especies de fiálides; las ramas están en una o varias series. Células conidiógenas monofiálides, discretas, conidios catenados, secos, semi- endógenos, esféricos, de diversos colores, suaves o rugosos en ocasiones equinulados, a veces con espinas dispuestas en espiral, o septados (Samson *et al.*, 2014).



En el Cuadro 1, se presentan imágenes de las características culturales y morfológicas de seis cepas del género *Aspergillus* identificadas en este trabajo y ordenadas de la siguiente manera: *Aspergillus* 1 (aislamiento 5), *Aspergillus* 2 (aislamiento 61), *Aspergillus* 3 (aislamiento 81), *Aspergillus* 4 (aislamiento 100), *Aspergillus* 5 (aislamiento 111) y *Aspergillus* 6 (aislamiento 119). Además, los que fueron correctamente secuenciados, permitieron confirmar el género alcanzado.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 <p>Objetivo 40x [Barra = 50 µm].</p>
		 <p>Objetivo 40x [Barra = 50 µm].</p>
		 <p>Objetivo 20x [Barra = 100 µm].</p>





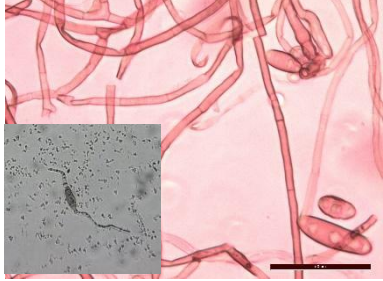
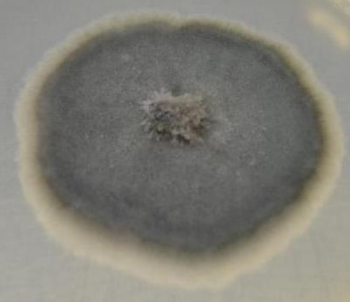
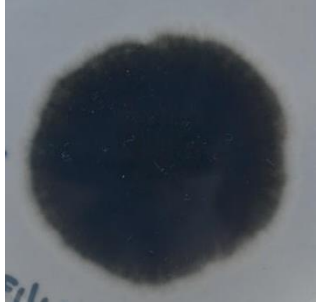

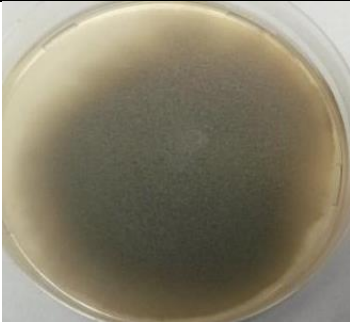


**Género:** *Bipolaris*, Clase: Dothideomycetes, Orden: Pleosporales, Familia: Pleosporaceae.

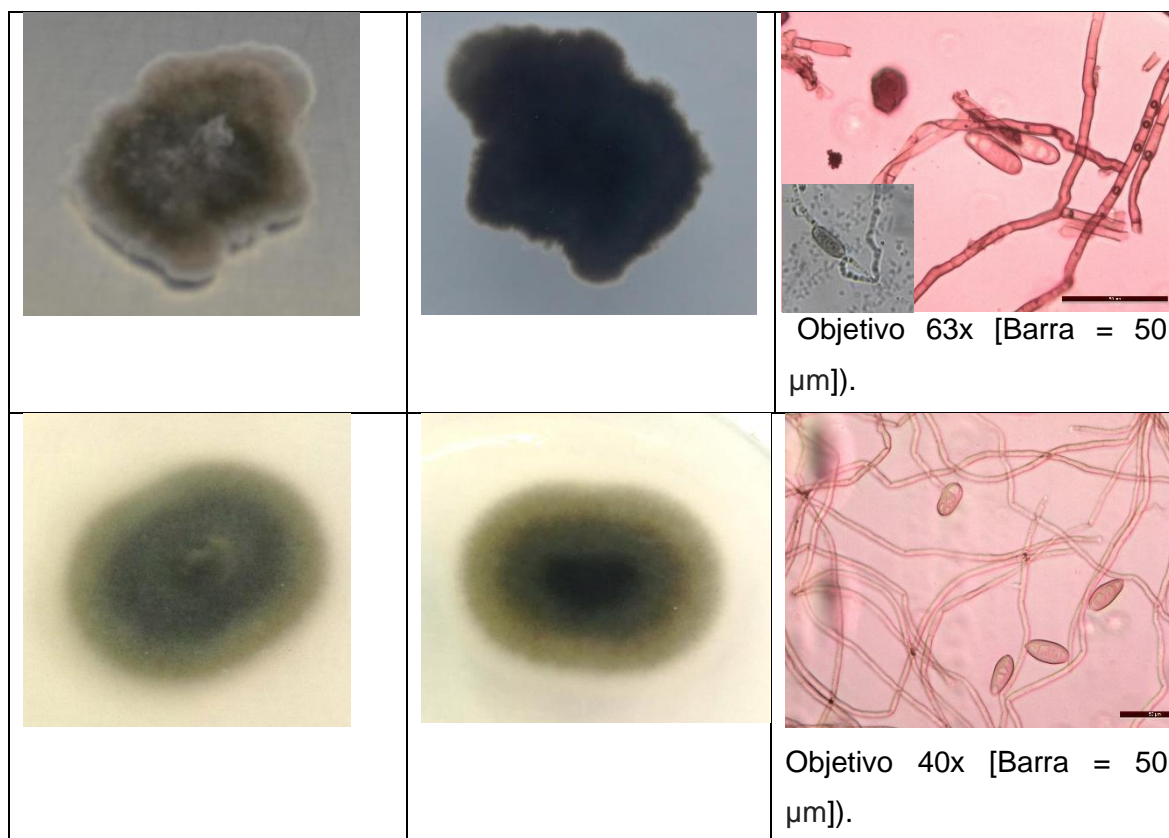
Este género produce colonias de crecimiento rápido, con micelio inicialmente de color gris claro a marrón grisáceo, adquiriendo color verde oliva a negra a medida que van madurando; el reverso es de coloración oliva a negro. Las hifas son septadas, de color castaño, con conidióforos castaños, simples o ramificados, geniculados y simpodiales, con numerosas cicatrices en los sitios donde surgen los conidios. Conidios tabicados (pseudoseptos), cilíndricos o fusoides, de color castaño claro a oscuro, con hilo pigmentado, apenas protuberante (Manamgoda *et al.*, 2014).

Al respecto, se obtuvieron varios aislamientos correspondientes al género, los cuales fueron agrupados por características culturales y microscópicas, según el siguiente orden



de detalle: *Bipolaris* 1 (aislamiento 59 y 60), *Bipolaris* 2 (aislamiento 42), *Bipolaris* 3 (aislamiento 63, 65 y 71), *Bipolaris* 4 (aislamiento 44), y *Bipolaris* 5 (aislamiento 62) (Cuadro 2). Además, los que fueron correctamente secuenciados, permitieron confirmar el género alcanzado.

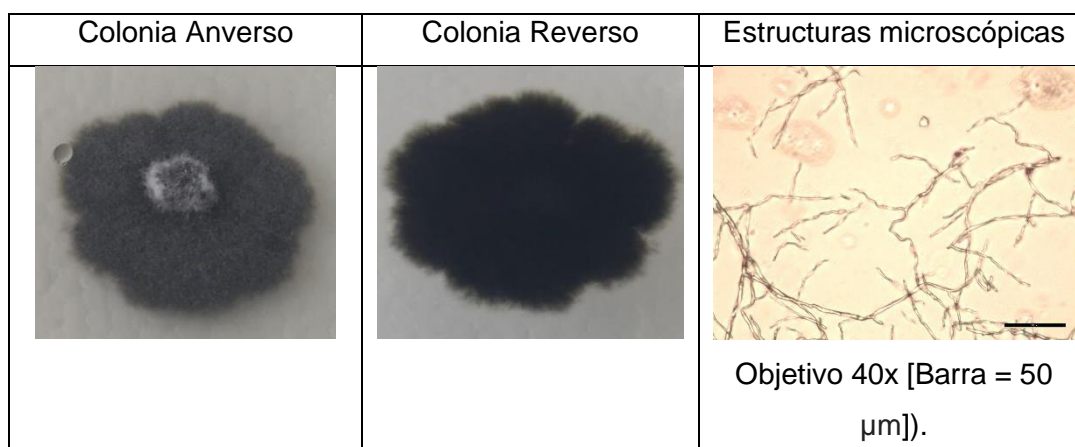
Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 <p data-bbox="986 772 1369 862">Objetivo 63x [Barra = 50 µm]).</p>
		 <p data-bbox="986 1182 1386 1272">Objetivo 40x [Barra = 50 µm]).</p>
		 <p data-bbox="986 1597 1386 1686">Objetivo 63x [Barra = 50 µm]).</p>



**Género:** *Cercospora*, Clase: Dothideomycetes, Orden: Capnodiales, Familia: Mycosphaerellaceae

Este género comprende numerosas especies, con desarrollo de colonias pequeñas, por lo general, de crecimiento lento; conidios vermiformes, algunos filiformes, rectos o curvados, multitabcados, de coloración hialina o ligeramente coloreados; conidióforos simples o ramificados, fasciculados, oscuros (Tessmann *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2015).

- *Cercospora dianellicola* Crous: Aislamientos 131, 138b y 141a. Clasificado molecularmente.





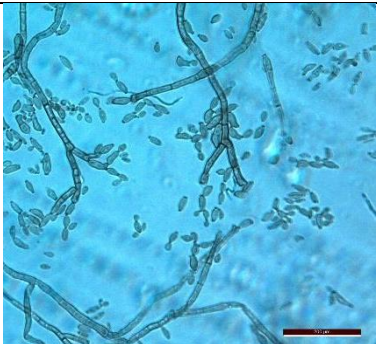
**Características culturales:** colonias que se elevan por encima de la superficie, extendidas, con micelio aéreo moderado y márgenes plumosos, lobulados, alcanzando 40 mm de diámetro después de 1 mes a 25°C en agar PDA. Son de color gris oliváceo y de reverso gris hierro (Crous *et al.*, 2017).

---

**Género:** *Cladosporium*, clase: Dothideomycetes, Orden: Pleosporales, Familia: Pleosporaceae.

Los hongos crecen rápidamente *in vitro* formando colonias pigmentadas de color oscuro (mohos pigmentados), con pliegues radiales, de color verde oliva a marrón oscuro de estructura similar a un polvo. Las colonias se forman después de cinco días. La identificación y diferenciación de especies es posible después del cultivo en agar papa dextrosa a una temperatura de 25 °C. Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena (Tasić y Miladinović-Tasić, 2007; Bensch *et al.*, 2013).

- *Cladosporium* sp.: Aislamiento 30. Clasificado morfológica y molecularmente.


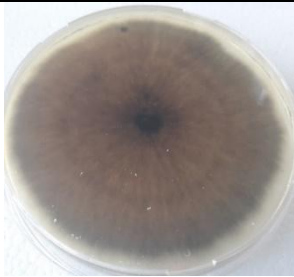
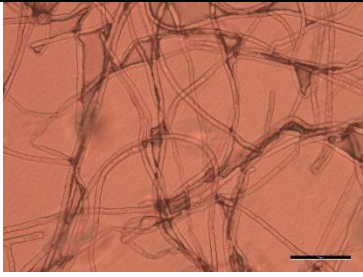
Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 <p>Objetivo 40x [Barra = 50 μm]).</p>

---

**Género:** *Curvularia*, Clase: Dothideomycetes, Orden: Pleosporales, Familia: Pleosporaceae

Colonias efusas, de color castaño café, grises o negras, micelio algodonoso o aterciopelado. Estroma a menudo largo, erecto, negro, cilíndrico, en ocasiones ramificado, formado en muchas especies en cultivos especialmente en sustratos firmes. Conidióforos macronematosos, mononematosos, rectos o ligeramente curvos, a menudo geniculados, nodosos, de color castaño, usualmente suaves, células conidiógenas politétricas, integradas, terminales en ocasiones con el tiempo se vuelven intercalares, cilíndricas, en ocasiones hinchadas. Conidios de diversas formas (curva, clavada, fusiforme, ovoide a piriforme), a menudo con 3 o más septos transversales, de castaño claro a oscuro, en ocasiones con bandas oscuras en los septos, de suaves a verrucosas; hilum en algunas especies es protuberante (Manamgoda *et al.*, 2012, 2015; Marín-Félix *et al.*, 2020). Fueron identificadas las siguientes especies correspondientes al género *Curvularia*: *lunata*, *micropus*, *asianiensis*, *coatesiae* y *geniculata*.

- *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn: Aislamiento 122b. Clasificado molecularmente.

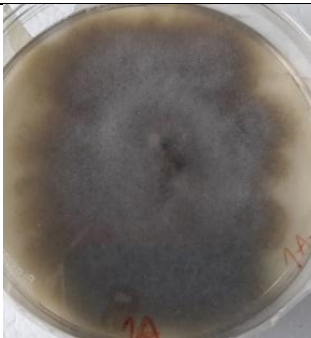

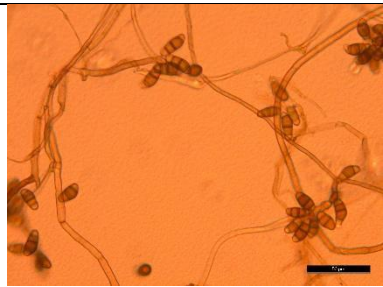
Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 <p>Objetivo 40x [Barra = 50 <math>\mu</math>m]).</p>

**Características culturales:** colonias grisáceas aplanadas en el anverso y pigmentación negra en el reverso. La tasa de crecimiento es de  $3,61 \pm 0,3$  cm / día (Kusai *et al.*, 2016).

**Características microscópicas:** Conidios con 3 tabiques, lisos, a menudo curvos en la tercera célula desde la base, la cual es larga como las otras células intermediarias, color castaño, con la célula terminal subhialina a castaño claro, hilum no protruyente, plano, oscuro y engrosado. Conidióforos septados, simples o ramificados (Kusai *et al.*, 2016).

- *Curvularia micropus* (Drechsler) Hern.-Restr, Y.P. Tan & Crous, 2018: Aislamiento 122a, 127 y 130. Clasificado morfológica y molecularmente.



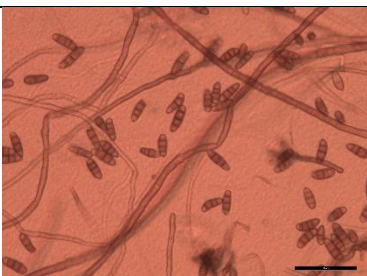


Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 Objetivo 40x [Barra = 50 $\mu$ m]).

**Características culturales:** Colonia de crecimiento irregular, micelio aéreo chato, color gris, adquiriendo una tonalidad gris verdosa hacia los bordes, los cuales se observan sin forma definida. En el reverso, la colonia se observa de un color gris verdoso (Iturrieta-Gonzalez *et al.*, 2020).

**Características microscópicas:** Conidios ligeramente curvos, con 3 tabiques (uno de ellos engrosado), con las células del medio color castaño claro, mientras las células de los extremos de color más claro. Conidióforos algo rectos, de color castaño oscuro, geniculados en el extremo en el cual se agrupan varios conidios conidios (Iturrieta-Gonzalez *et al.*, 2020).

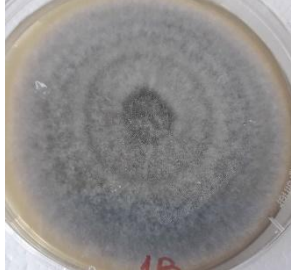
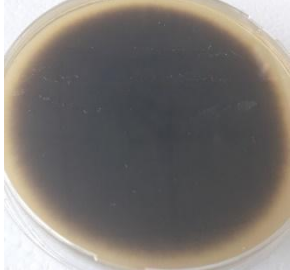

- *Curvularia coatesiae* Y.P. Tan & R.G. Shivas: Aislamiento 139b y 140. Clasificado morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 Objetivo 40x [Barra = 50 $\mu$ m]).

**Características culturales:** Colonias en PDA con micelio aéreo algodonoso, de color gris oliváceo en el centro a gris castaño hacia los bordes; reverso de color gris oscuro con bordes difusos algo irregulares (Tan *et al.*, 2018).

**Características microscópicas:** Conidios elipsoidales a obovoides, color castaño oscuro, tabicados, con las células intermedias asimétricas, siendo las dos células de ambos extremos de color castaño claro; hilo protuberante. Conidióforos erectos, flexuosos, geniculados, color castaño, tabicados (Tan *et al.*, 2018).

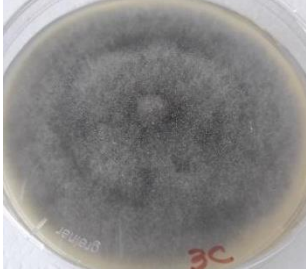

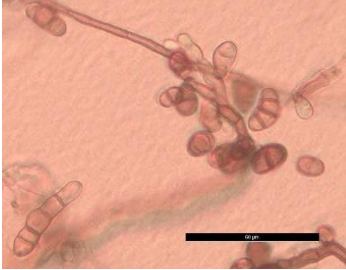
- *Curvularia asianiensis* L. Cai & K. D. Hyde: Aislamiento 129. Clasificado morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 Objetivo 40x [Barra = 50 μm]).

**Características culturales:** colonias de aspecto aterciopelado, color gris oliváceo pálido, reverso de color castaño oscuro a negro. La tasa de crecimiento micelial promedio en medio PDA de  $13,5 \pm 1,4$  mm / día (Manamgoda *et al.*, 2015; Kee *et al.*, 2020).

**Características microscópicas:** conidióforos septados, de color castaño pálido a oscuro, simples o ramificados, a veces ligeramente geniculados en los ápices. Conidios solitarios, rectos, curvos, elipsoides, de color castaño, con 3 a 4 tabiques. Célula central ensanchada y las células en ambos extremos más pálidas que otras (Manamgoda *et al.*, 2015; Kee *et al.*, 2020).

- *Curvularia geniculata* (Tracy & Earle) Boedijn: Aislamiento 139a. Clasificado morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 Objetivo 40x [Barra = 50 μm]).

**Características culturales:** colonias esponjosas con micelio aéreo gris y blanco. La pigmentación fue de color gris oscuro a amarillento y formó anillos cuando envejeció (Kusai *et al.*, 2016).

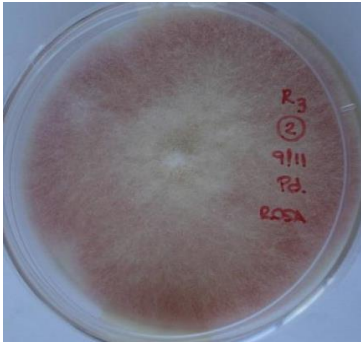
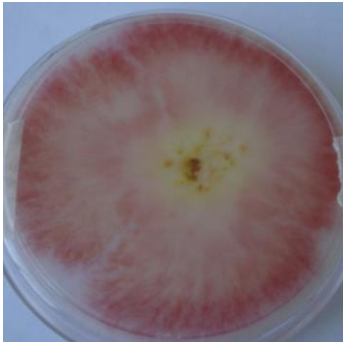

**Características microscópicas:** los conidios son curvos, fusiformes, geniculados, 3-4 distoseptos, pero generalmente con 4 septos, raramente 5, célula basal y apical de color castaño claro, mientras las intermedias con castaño oscuro, a veces la célula central más grande y oscura que las otras células a casi rectos y en forma de bote debido al agrandamiento desproporcionado. dependiendo de los aislamientos o las condiciones culturales en las que se produjeron (Hosokawa *et al.*, 2003, Manamgoda *et al.*, 2012).

**Género:** *Fusarium*, Clase: Sordariomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Nectriaceae

Colonias de aspecto algodonoso en medios de cultivo, a menudo con una coloración rosa, púrpura o amarilla, en el micelio o en el medio. Conidióforos variables, delgados y simples, o robustos y cortos, ramificados irregularmente, con un ramillete de fialides, simples o agrupadas en esporodoquios; conidias (fialosporas) hialinos, variables, principalmente de dos tipos, a menudo contenidos en pequeñas cabezas húmedas, macroconidio ovoide a oblongo, simple o en cadenas; algunos conidios intermedios, 2-3 células, oblongos o ligeramente curvados. Algunas especies forman esporodoquios y clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983).

Al respecto, se obtuvieron dos aislamientos correspondientes al género, los cuales fueron agrupados por características culturales y microscópicas, según el siguiente detalle: *Fusarium sp. 1* (aislamiento 2) y *Fusarium sp. 2* (aislamiento 26) (Cuadro 3).

- *Fusarium sp. 1*: Aislamiento 2. Clasificados morfológica y molecularmente.

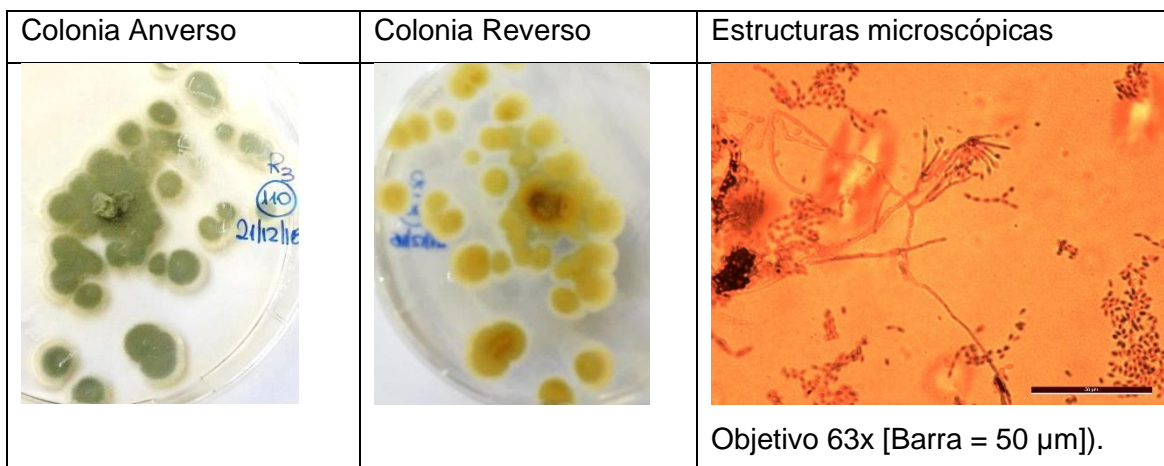
Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		 <p>Objetivo 63x [Barra = 50 <math>\mu</math>m]).</p>



**Género:** *Penicillium*, Clase: Eurotiomycetes, Orden: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae

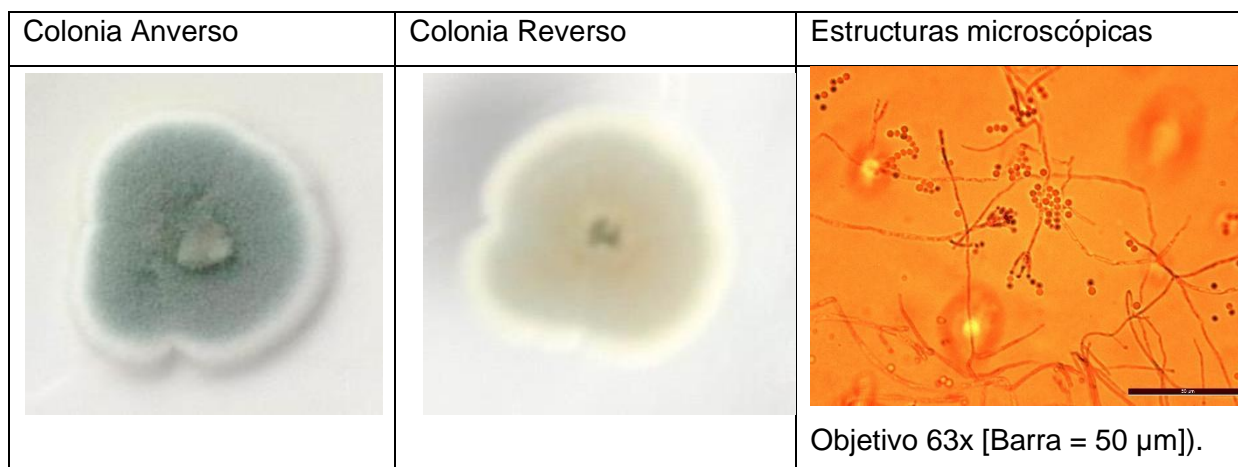
Colonias algodonosas, aterciopeladas o pulverulentas, inicialmente blancas y vellosas, cuya superficie puede presentar exudados en la superficie y pigmentaciones rojizas al reverso. Esporas pigmentadas de color verde, azul verdosa o amarilla; conidióforos surgen del micelio simple o en ramificaciones cerca al ápice, peniciliados, terminando en un grupo de fialides. Conidios hialinos, unicelulares, forma globosa u ovoide en cadenas basipetas, secas (Barnett y Hunter, 1998).

- *Penicillium sp. 1*: Aislamiento 110. Clasificado morfológica y molecularmente.





- *Penicillium chrysogenum* Thom: Aislamiento 68 y 70. Clasificado morfológica y molecularmente.



**Características culturales:** colonias de color verde oscuro y verde claro con anillo blanquecino en la periferia, textura afelpada, algodonosa, centro elevado. Colonias de crecimiento rápido, reverso color crema-beige (Visagie *et al.*, 2014).

**Características microscópicas:** hifas tabicadas, conidióforos terverticilados (con ramificaciones abundantes). Estos son delgados y de paredes lisas, midiendo 250-500 µm. Las métulas (ramificaciones del conidióforo) tienen paredes lisas y las fiálides son ampuliformes (con forma de botella), y muchas veces con las paredes gruesas. Las conidias son subglobosas hasta elípticas, de 2,5 - 3,5 µm de diámetro y paredes lisas cuando se observan con el microscopio óptico. En el microscopio electrónico de barrido las paredes son tuberculadas (Visagie *et al.*, 2014).

---

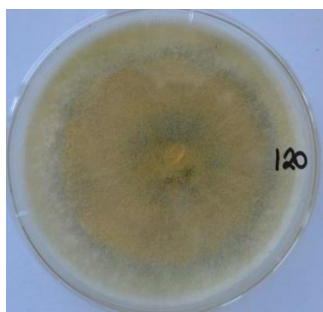

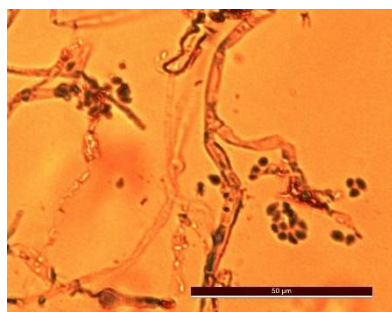
**Género:** *Trichoderma*, Clase: Sordariomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Hypocreaceae

Micelio aéreo algodonoso, de aspecto pulverulento, al inicio de color blanquecino, luego adquiriendo pigmentaciones verdes en diferentes tonalidades. Conidióforos hialinos ramificados, con fiálides simples o en grupos; conidios de 3 a 5 µm de diámetro, ovalados, unicelulares, ligeramente coloreados (usualmente verdes), de rápido desarrollo en medios sintéticos. Pueden desarrollar clamidosporas (de vital importancia para la sobrevivencia del hongo en el suelo bajo condiciones adversas), (Martínez *et al.*, 2013).

- *Trichoderma sp. 1*: Aislamiento 64. Clasificado morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		
		Objetivo 63x [Barra = 50 µm].

- *Trichoderma amazonicum* P. Chaverri & Gazis: Aislamiento 73, 112 y 120. Clasificado morfológica y molecularmente.

Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
		
		Objetivo 63x [Barra = 50 µm].

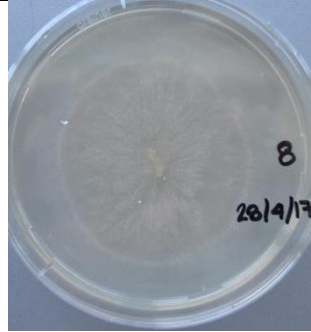
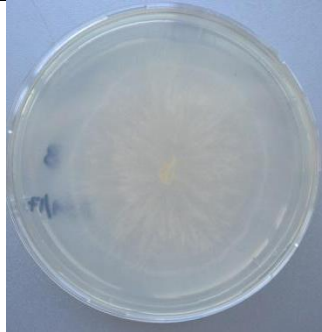




**Características culturales:** colonia de crecimiento rápido, con una coloración inicialmente blanca, y luego se torna al verde-amarillo. El envés es de aspecto ámbar, amarillo-verde. Aspecto algo algodonosas, conidios verdes que se forman en anillos concéntricos gruesos y densos, no se forman pústulas; olor ligeramente afrutado (Chaverri *et al.*, 2011).

**Características microscópicas:** los conidióforos no están bien definidos, se ramifican generalmente 2-3 veces en forma piramidal, con las ramas más largas emparejadas cerca de la base del eje principal. Cada rama produce métulas cilíndricas o en forma de barril, con fiálides adheridas en ángulos amplios o con menos frecuencia produciendo fiálides solitarias. Clamidosporas de globosas a subglobosas, hialinas, de paredes delgadas, formadas en grupos grandes y apretados que germinan rápidamente (Chaverri *et al.*, 2011).

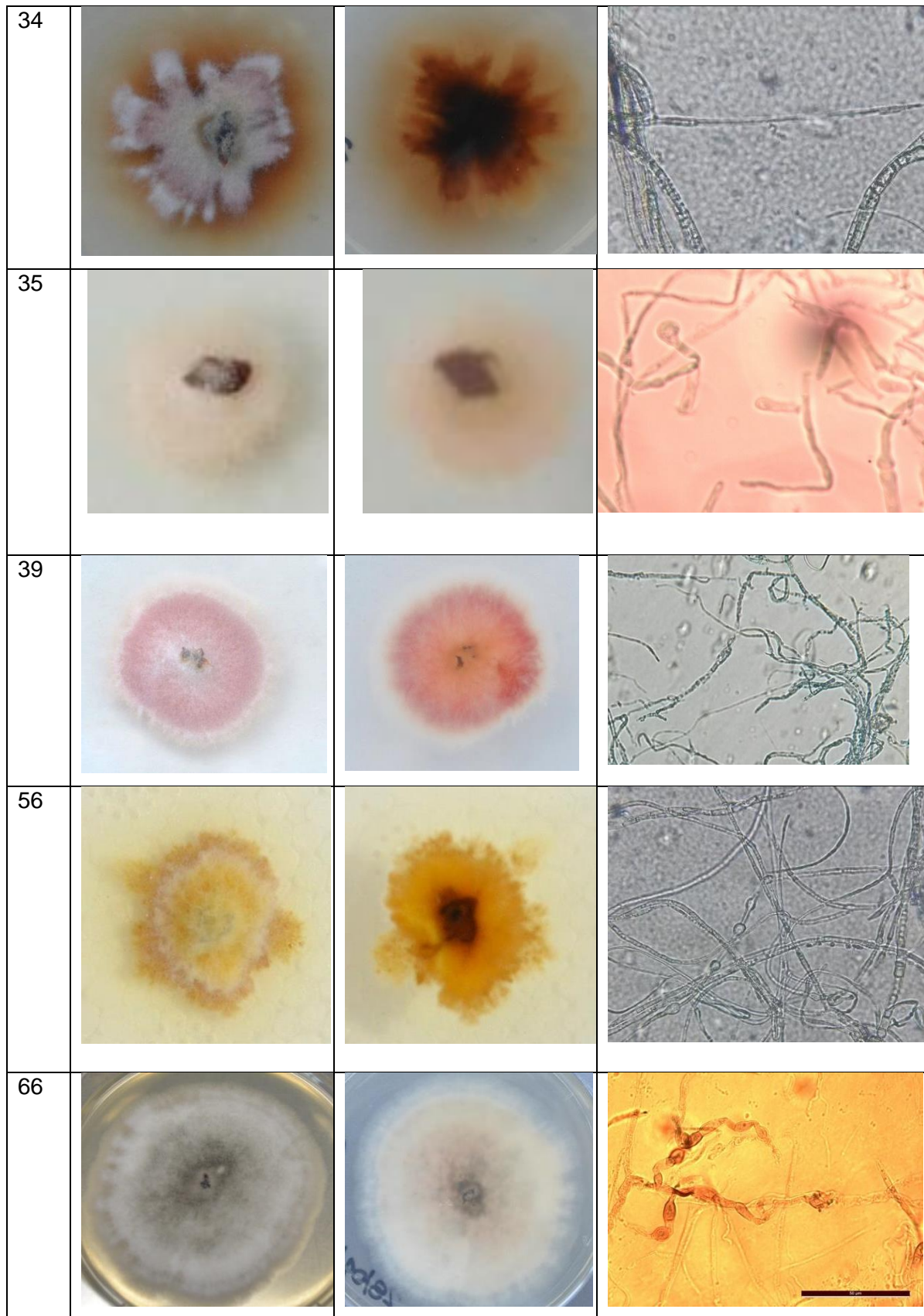
Además de los géneros descritos anteriormente, se aislaron 22 cepas de hongos endofitos desconocidos. Esto se debió a que fueron no esporulantes, con desarrollo de micelio estériles, de mala calidad de extracción o secuenciación de ADN, o secuencias menores de 50 pb. Todas ellas pertenecen también al Phylum Ascomycota, lo cual demuestra la amplia población de endofitos asociada a este tipo de hospedantes y de la cual se desconoce su función en esta interacción.




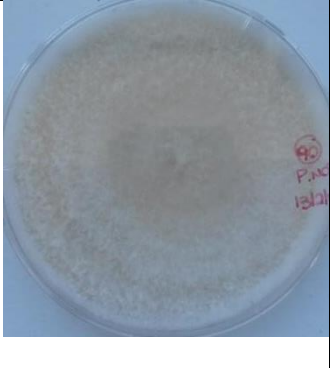



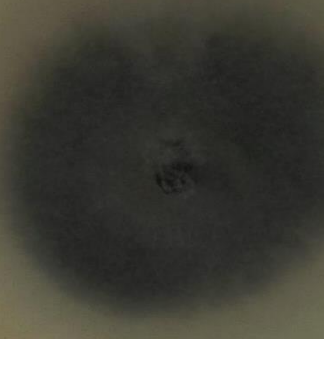

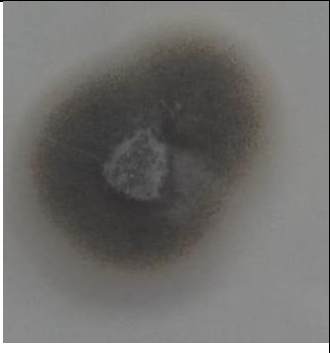





La característica principal de los hongos del Phylum Ascomycota es la presencia de ascosporas (esporas sexuales) encerradas en unos pequeños sacos llamados ascos. Poseen reproducción sexual y asexual, pero el estado asexual (anamorfo) constituido por hifas haploides, tabicadas, es forma más común en que podemos encontrar estos hongos en la naturaleza. La formación de conidias (esporas asexuales) es el tipo de reproducción asexual más frecuente en los ascomicetos, la cual se origina a partir de una hifa especializada llamada conidióforo que puede presentarse solitaria o agrupadas tomando diversas formas.

A continuación, en el cuadro 3, se muestran mediante imágenes las características culturales y morfológicas de este grupo de hongos los cuales no pudieron ser caracterizados a nivel de género (Id = Identificación del aislamiento).

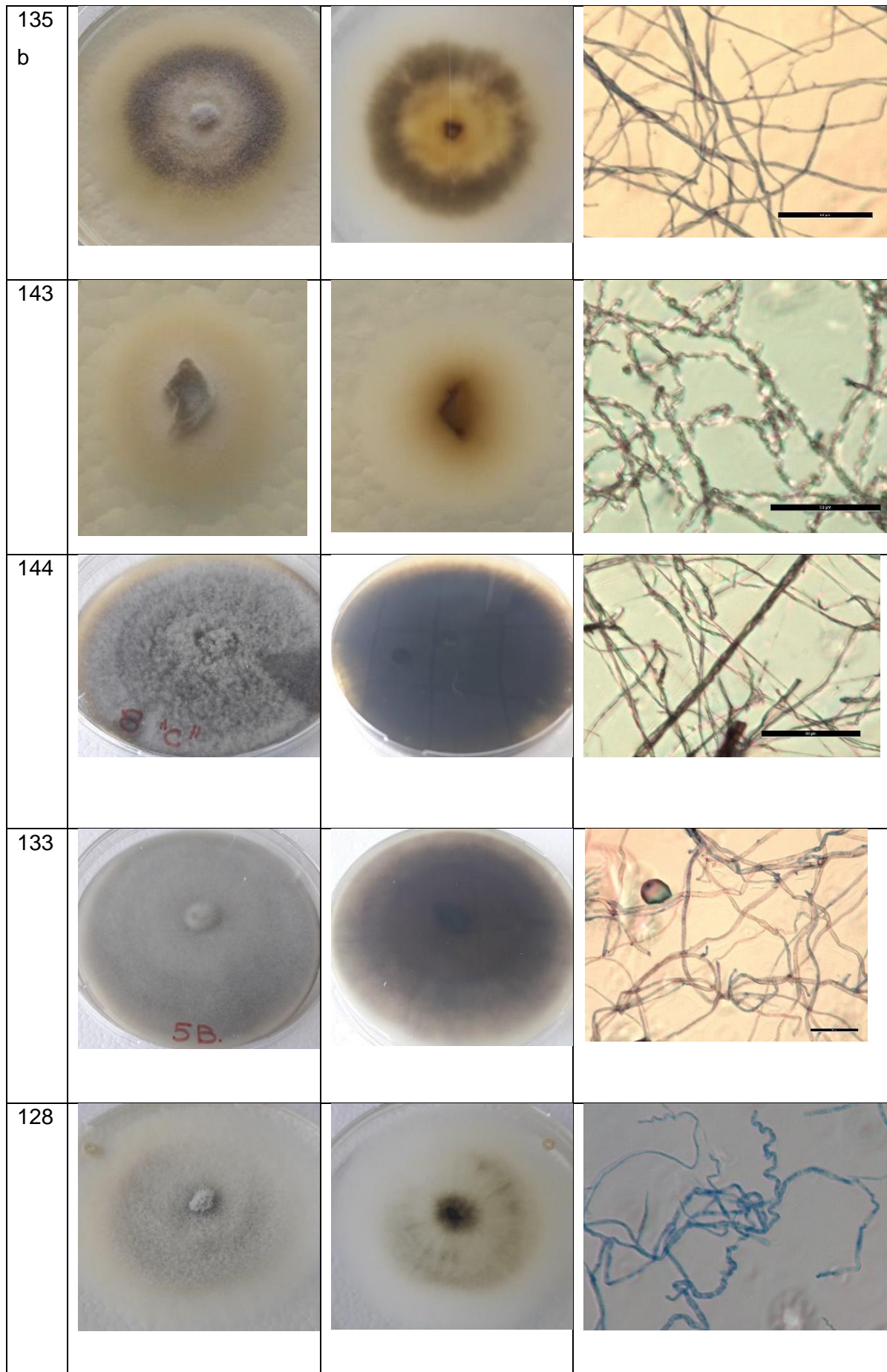
Id.	Colonia Anverso	Colonia Reverso	Estructuras microscópicas
8, 37			
67, 104 y 135a			

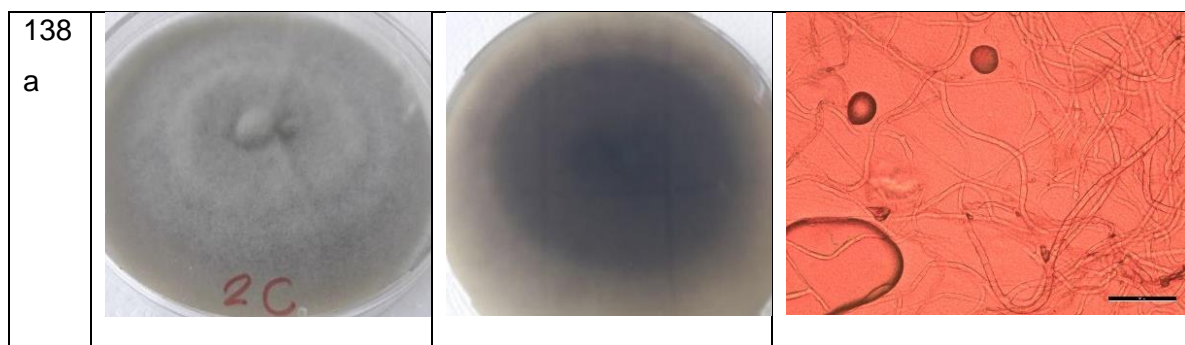




88			
90			
92, 98			
114			
132			



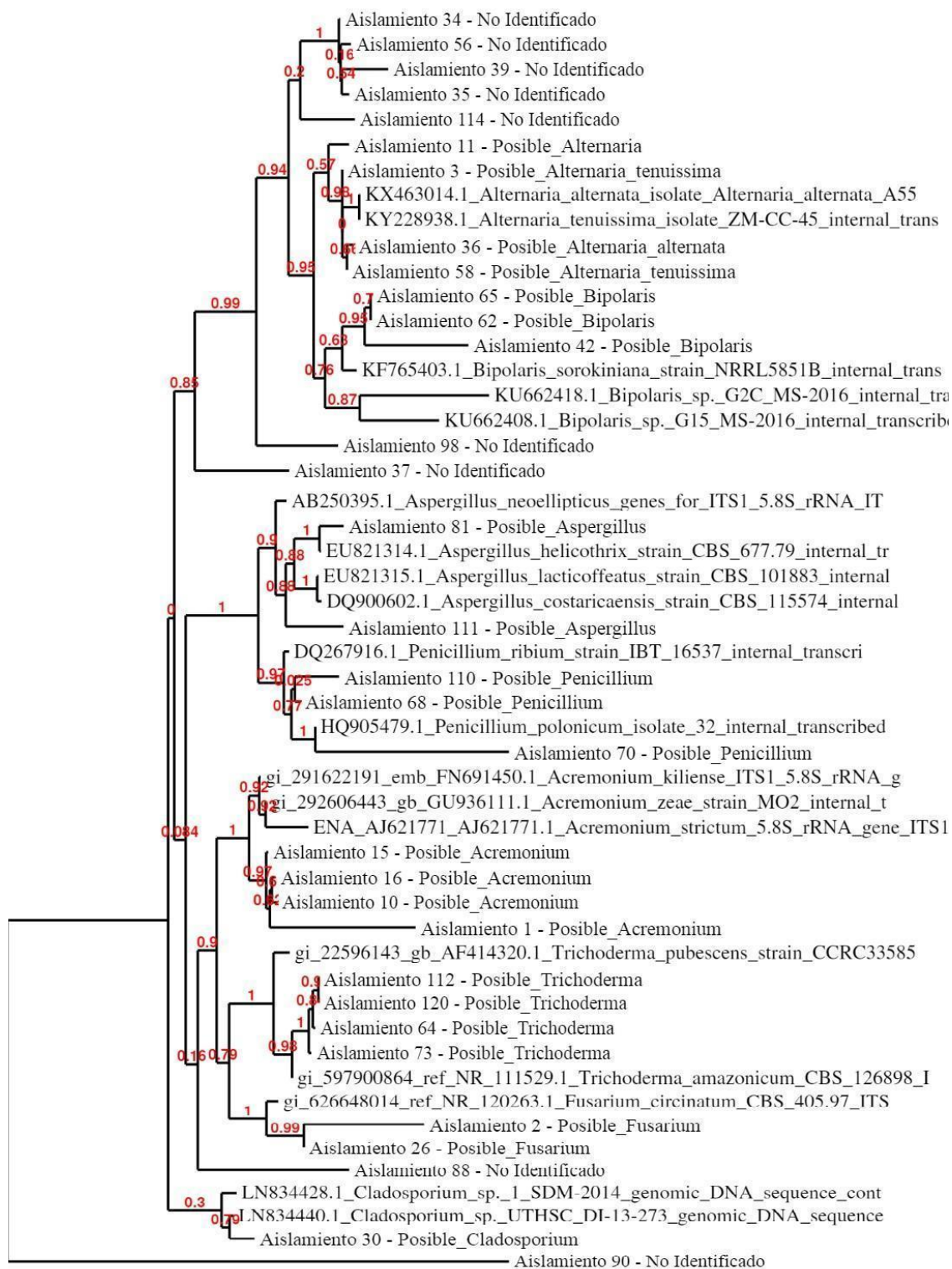




## CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y DESARROLLO DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

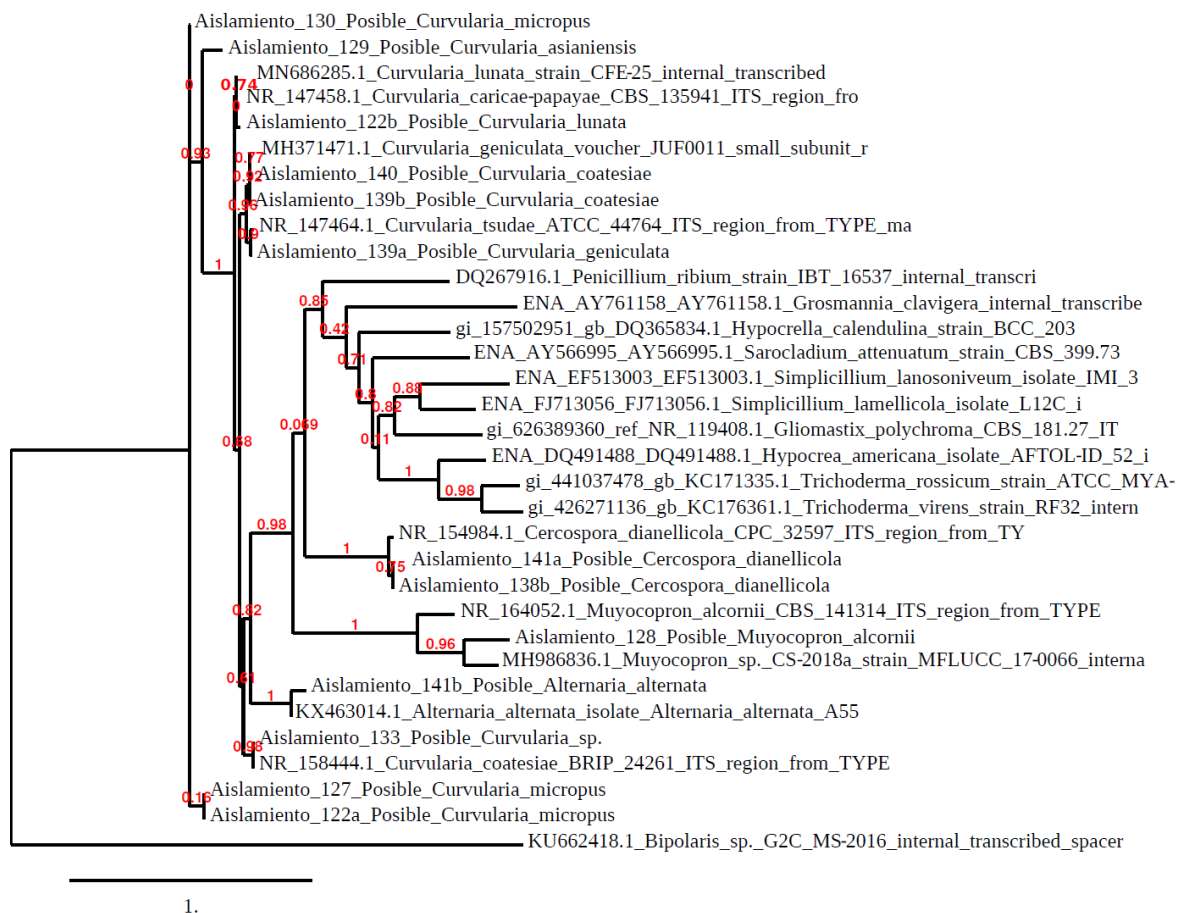
Las secuencias obtenidas de Macrogen Inc. (Corea) fueron analizadas con el programa Sequencher versión 4.1.4 (demo) donde las correspondientes a los cebadores específicos fueron detectadas y eliminadas. La longitud de las resultantes varió entre 500-600 pb, tal como es esperada para esa combinación de cebadores y 44 fueron registradas como accesiones en DDBJ database (LC425657 a LC425688 y LC605628 a LC605640). A su vez, se llevó a cabo una búsqueda de secuencias ITS de géneros y especies fúngicas conocidas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para la elaboración de árboles filogenéticos.

Utilizando el software *Phylogeny*, se analizaron ambos tipos de secuencias dando como resultado dos árboles filogenéticos (Dereeper *et al.*, 2008). Estas secuencias utilizadas como modelo permitieron determinar en el dendograma la cercanía con las secuencias encontradas en este estudio y confirmar o descartar las clasificaciones morfológicas a nivel de género e incluso, en algunos casos, alcanzar nivel de especie fúngica. Los endofitos fúngicos que no esporularon y no cumplieron los requisitos necesarios para la clasificación morfológica o molecular, fueron clasificados como 'No Identificados'.



**Figura 4:** Análisis filogenético (A), Árbol obtenido de la alineación de secuencias ITS (ITS1–5.8S – ITS2) de 32 aislamientos de *P. dilatatum* (vegetativo y reproductivo) y del estado vegetativo de *P. notatum*, junto a 19 secuencias del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Depetris *et al.*, 2020).





**Figura 5:** Análisis filogenético (B), Árbol obtenido de la alineación de secuencias ITS (ITS1 – 5.8S – ITS2) de 13 aislamientos de *P. notatum* en estado reproductivo y 20 secuencias del sitio NCBI.

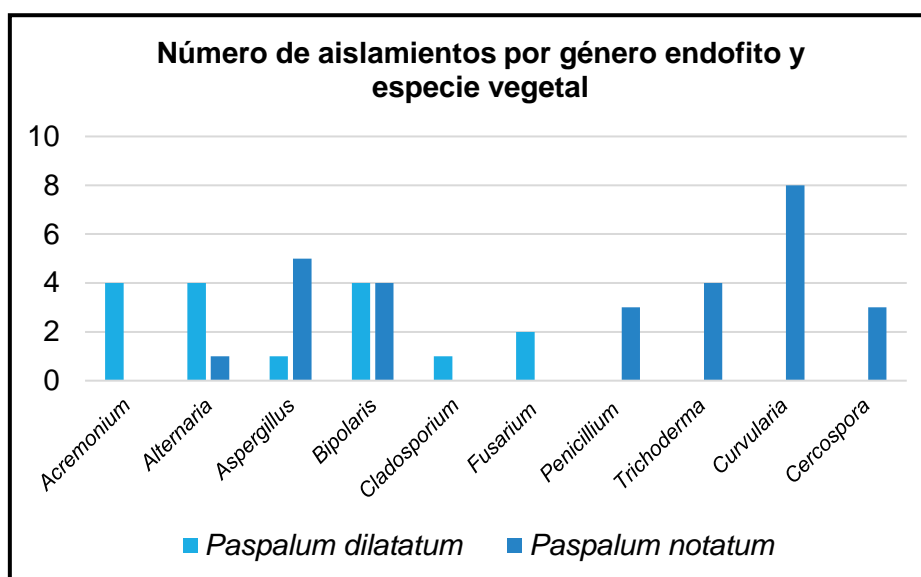
## DIVERSIDAD ENDOFITA EN DISTINTAS SITUACIONES / CONDICIONES

### DIVERSIDAD ENDOFITA EN DIFERENTES ESPECIES DE PASPALUM Y REGIONES CLIMÁTICAS

En *P. dilatatum* colectado en la localidad de Zavalla, en el lote 18 de pastura natural del campo experimental Villarino, se hallaron 22 aislamientos de un total de 60 plantas colectadas. El porcentaje de aislamientos en el total de plantas correspondió al 37%, el total de plantas infectadas fue de 22 con un porcentaje de infección endofita de 36,67% y 6 aislamientos no lograron identificarse. Los géneros aislados fueron *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium* y *Fusarium*. Los mayores porcentajes de ocurrencia correspondieron a *Acremonium*, *Alternaria* y *Bipolaris*. El número de aislamientos por género endofito y el porcentaje de ocurrencia por género se detallan en los gráficos de la Figura 6 y 7 respectivamente.

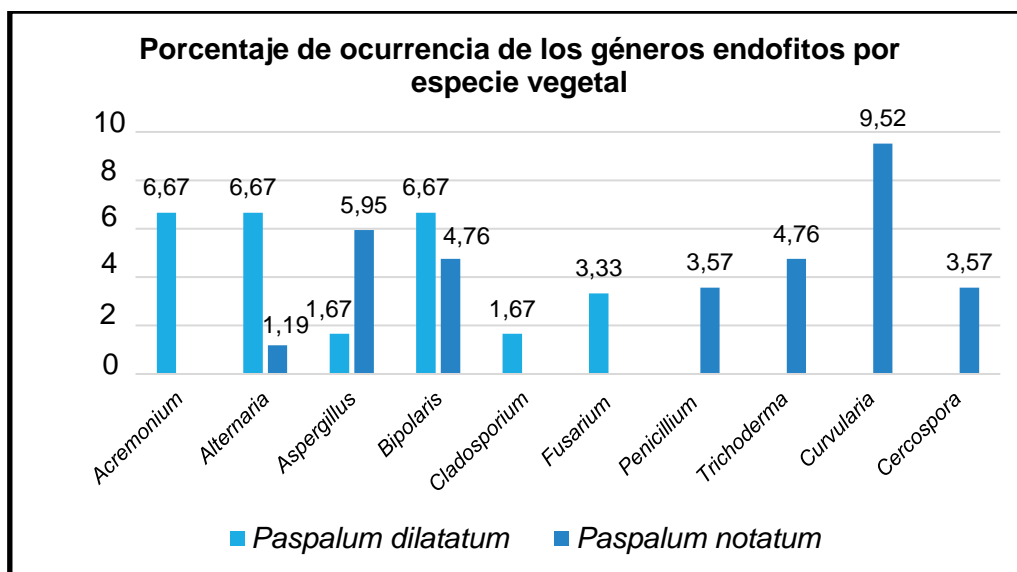
En *P. notatum* muestreado en la pastura natural de la localidad de Riachuelo, se aislaron un total de 44 endofitos en 84 plantas analizadas. El porcentaje de aislamientos en el total de plantas correspondió al 52%, el total de plantas infectadas fue de 39 con un porcentaje de infección endofita de 46,43%. En este caso, hubo 5 plantas con más de un aislamiento y 16 endofitos no pudieron ser identificados. Los géneros aislados fueron *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Curvularia* y *Cercospora*. Los mayores valores de porcentajes de ocurrencia corresponden a *Aspergillus* y *Curvularia*. El número de aislamientos por género endofito y el porcentaje de ocurrencia por género se detallan en los gráficos de la Figura 6 y 7 respectivamente.

Los géneros *Alternaria*, *Aspergillus* y *Bipolaris* fueron encontrados en ambas especies vegetales y regiones. *Penicillium*, *Trichoderma*, *Curvularia* y *Cercospora* fueron hallados únicamente en *P. notatum* mientras que *Acremonium*, *Cladosporium* y *Fusarium* solo en *P. dilatatum*.



**Figura 6:** Número de aislamientos por género endofito y especie vegetal.

Los mayores valores de porcentaje de ocurrencia de los géneros por especie vegetal corresponden a *Bipolaris* (6,67%) y *Curvularia* (9,52%). Dado que existen diferencias en el número de plantas analizadas por especie, se tuvieron en cuenta como parámetros más relevantes para el análisis, los porcentajes (Figura 7) en lugar del número de aislamientos por especie (Figura 6).



**Figura 7:** Porcentaje de ocurrencia de los géneros endofitos por especie vegetal.

## DIVERSIDAD ENDOFITA EN DISTINTOS MOMENTOS FENOLÓGICOS

En *P. dilatatum*, se analizaron 37 plantas en estado vegetativo y 23 en estado reproductivo dando un total de 60 plantas evaluadas en la especie, siendo 22 las plantas infectadas (E+).

El porcentaje de infección en vegetativo fue el más alto, 43,24% (16 aislamientos en 37 plantas). Los mayores valores de porcentaje de ocurrencia se observaron en estado vegetativo para las categorías: No identificados (16%), *Bipolaris* (10,8%) y *Alternaria* (8,1%). Incluso, *Bipolaris* fue encontrado únicamente en este momento fenológico y en cuanto a la diversidad fueron similares ya que se identificaron 4 géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*, junto con los no identificados que fueron 6 aislamientos distintos.

En estado reproductivo no se reportaron aislamientos no identificados, quedando aislados organismos de los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium*, contribuyendo a una diversidad de 5 géneros endofitos. El porcentaje de infección fue de 26% y el de ocurrencia de los géneros fue menor al 8,7%, siendo el más frecuente en este estado el género *Acremonium*. Por otro lado, *Aspergillus* y *Cladosporium*, fueron hallados únicamente en este momento fenológico. El total de aislamientos en 23 plantas en estado reproductivo fue de 6 endofitos lo que corresponde a un total de 26,09%.

Los géneros *Acremonium*, *Alternaria* y *Fusarium*, estuvieron presentes en ambos momentos de muestreo.

**Tabla 5.** Número de aislamientos y % de Ocurrencia en *P. dilatatum*

Géneros Endofitos	Nº de aislamientos <i>P. dilatatum</i>	Nº de aislamientos		% de Ocurrencia	
		Vegetativo (V)	Reproductivo (R)	R	V
<i>Acremonium</i>	4	2	2	8,70	5,41
<i>Alternaria</i>	4	3	1	4,35	8,11
<i>Aspergillus</i>	1	-	1	4,35	-
<i>Bipolaris</i>	4	4	-	-	10,81
<i>Cladosporium</i>	1	-	1	4,35	-
<i>Fusarium</i>	2	1	1	4,35	2,70
No identificados	6	6	-	-	16,22

<b>Total aislamientos</b>	22	16	6	26,09	43,24
<b>Total de plantas</b>	60	37	23	<b>% Infección</b>	
Total de plantas E+	22	16	6	26,08	43,24

En *P. notatum* se analizaron 60 plantas en estado vegetativo y 24 en estado reproductivo, dando un total de 84 plantas analizadas en la especie, siendo 39 las plantas infectadas (E+).

Se dio la situación inversa a la especie anterior, en estado reproductivo se encontraron los valores más importantes en porcentajes de infección con un 62,5% y de ocurrencia para el género *Curvularia* que obtuvo un 33% al igual que los no identificados. *Curvularia* fue hallado únicamente en este momento fenológico al igual que *Alternaria* y *Cercospora*, pero con una elevada ocurrencia y diversidad para lo que se ha manifestado en este estudio en especies de *Paspalum*.

El porcentaje de infección en vegetativo fue el más bajo, 40%. Los mayores valores de porcentaje de ocurrencia se observaron para las categorías: no identificados (13,3%) y *Aspergillus* (8,33%). En cuanto a la diversidad se identificaron 4 géneros: *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Penicillium* y *Trichoderma*, encontrados únicamente en este momento fenológico. El total de aislamientos fue de 24 en 60 plantas en estado vegetativo.

En esta especie, no hay géneros endofitos encontrados en ambos momentos fenológicos.

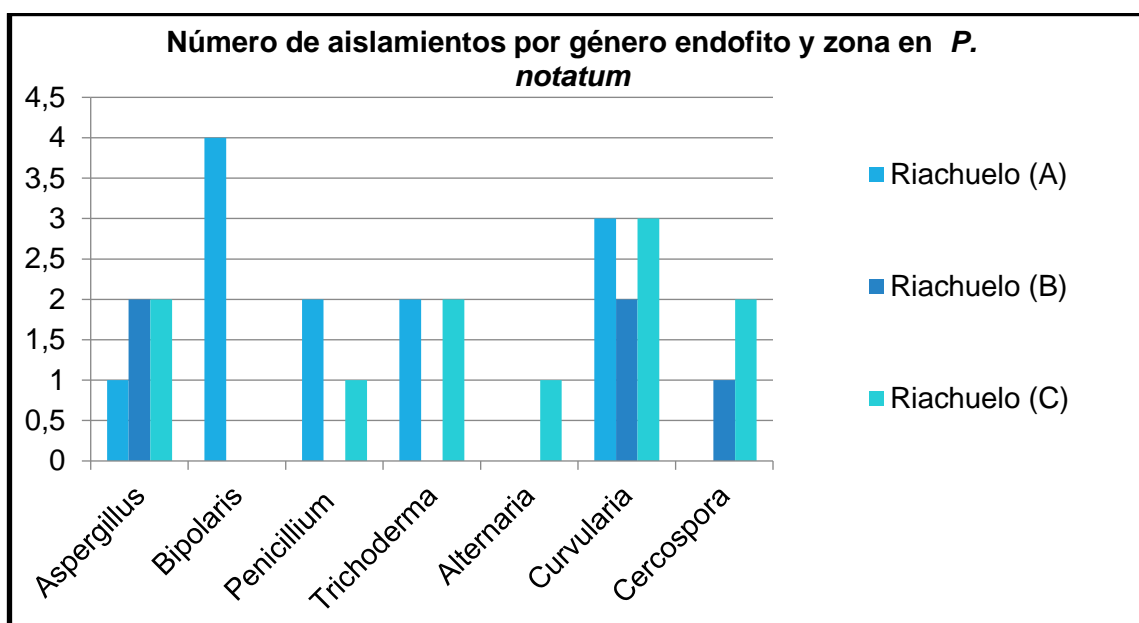
**Tabla 6.** Número de aislamientos y Porcentaje de ocurrencia en *P. notatum*

Géneros Endofitos	Nº de aislamientos <i>P. notatum</i>	Nº de aislamientos		% de Ocurrencia	
		Vegetativo (V)	Reproductivo (R)	(V)	(R)
<i>Alternaria</i>	1	-	1	-	4,17
<i>Aspergillus</i>	5	5	-	8,33	-
<i>Bipolaris</i>	4	4	-	6,67	-
<i>Penicillium</i>	3	3	-	5,00	-
<i>Trichoderma</i>	4	4	-	6,67	-
<i>Curvularia</i>	8	-	8	-	33,33
<i>Cercospora</i>	3	-	3	-	12,50

No identificados	16	8	8	13,33	33,33
<b>Total aislamientos</b>	44	24	20	40	83,33
<b>Total de plantas</b>	84	60	24	<b>% Infección</b>	
Total de plantas E+	39	24	15	40	62,5

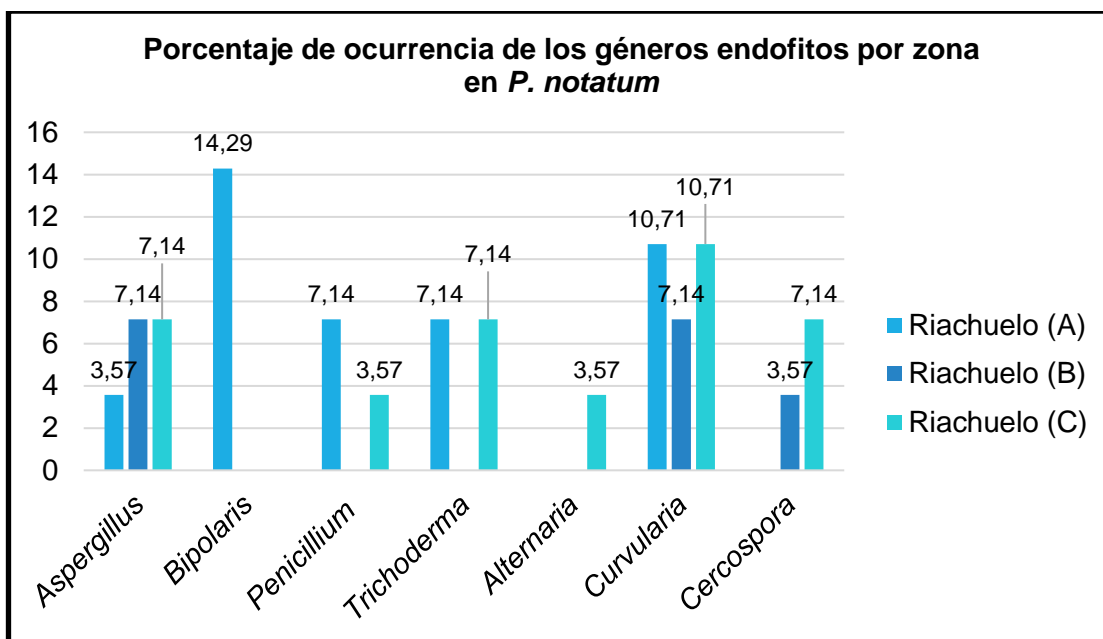
## DIVERSIDAD ENDOFITA EN DIFERENTES ECOSISTEMAS

En *P. notatum* se analizaron 28 plantas en cada una de las subzonas o ecosistemas de Riachuelo, dando un total de 84 plantas analizadas y 39 infectadas (E+). Estas áreas estaban determinadas por pradera (A), sabana dominada por Timbó (B) y sabana de Quebracho colorado (C). El porcentaje de infección endofita (E+) fue del 50%, 42,86% y 46,43%, la diversidad de géneros identificados fue de 5, 3 y 6 respectivamente. La cantidad de aislamientos fue de 15 en el área A, 13 en B y 16 en C (44 en total), no existiendo grandes diferencias entre ellas.



**Figura 8:** Número de aislamientos por género endofito y zona en *P. notatum*

De la figura 8 se concluye que *Aspergillus* y *Curvularia* estuvieron presentes en todas las áreas analizadas y *Bipolaris* fue hallado únicamente en la pradera (A). Los géneros *Penicillium* y *Trichoderma* se hallaron en las áreas A y C. Por otro lado, *Alternaria*, se aisló únicamente del área C, mientras que *Cercospora* de B y C.



**Figura 9:** Porcentaje de ocurrencia de los géneros endofitos por zona en *P. notatum*

En cuanto a los porcentajes de ocurrencia de los géneros endofitos, los mayores valores fueron para *Bipolaris*, obteniendo un porcentaje de 14,29% únicamente en la zona muestreada de pradera (A) y para *Aspergillus* y *Curvularia* que estuvieron presentes en todas las áreas muestreadas (A, B y C).



## DISCUSIÓN

En las pasturas naturales, los hongos desempeñan un rol importante dadas sus múltiples funciones: intervienen en los procesos de descomposición de seres vivos, forman relaciones mutualistas con plantas, o son patógenos. Los hongos asociados a las plantas silvestres, representan una fuente de recursos para el control biológico de plagas y patógenos o de productos farmacológicos como sustancias con actividad antimicrobiana. Por todo esto, el estudio de hongos asociados a pastos naturales puede aportar información valiosa referida a ecología y mejoramiento de pastos, fitopatología de cultivos o farmacología, sistemas de producción animal con pastos naturales (Sánchez Marquez *et al.*, 2004).

Usualmente la diversidad endofita asociada a una pastura en particular consiste en un número grande de especies fúngicas y una distribución muy desigual de riqueza, existiendo una correlación positiva entre la complejidad espacial y la riqueza de especies. Se ha indicado que el número de especies identificadas en un conjunto endofito depende del número de plantas y los lugares analizados. Por otro lado, es importante tener en cuenta que las diferencias entre el tamaño de hoja, la estructura anatómica y los componentes químicos entre especies de gramíneas y dentro de la misma planta, pueden afectar a la diversidad de los hongos que se encuentran en ellos (Sánchez-Márquez *et al.*, 2012). En conclusión, la diversidad endofita parece ser contexto dependiente.

La cantidad de géneros de hongos endofitos no sistémicos encontrados en los pastos, es muy diversa. Los taxones endofíticos dominantes reportados en pastos templados son: *Alternaria*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Epicoccum* y *Aureobasidium spp.* (Stone *et al.*, 2004). Esto sugiere que las especies endofíticas dominantes de pastos, tienen una baja especificidad del hospedante, encontrándose en múltiples especies de pastizales (Sánchez Márquez *et al.*, 2012; García Lemos *et al.*, 2017).

En este estudio, se logró identificar un total de diez géneros de hongos endofitos: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Se ha demostrado que *Paspalum* es hospedante de numerosos hongos endofíticos que pertenecen a más de diez géneros, incluido *Trichoderma sp.* que no ha sido reportado previamente en Argentina. Los endofitos aislados, son conocidos como *No Clavicipitaceos* clase 3, forman infecciones locales y se transmiten horizontalmente. Esto puede deberse a que son los endofitos fúngicos más comunes restringidos a los tejidos aéreos (Saikkonen *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2009; Zabalgogezcoa *et al.*, 2013). La posible razón por la cual no se encontraron endofitos

clavicipitaceos en este estudio podría deberse al hecho de que solo representan un pequeño número de endofitos y en hospedantes muy específicos (Rodríguez *et al.*, 2009).

---

## DIVERSIDAD ENDOFITA EN DIFERENTES ESPECIES DE PASPALUM Y REGIONES CLIMÁTICAS

En este estudio, se analizó la diversidad endofita de dos especies del género *Paspalum* en 2 sitios de muestreo dado que crecen en ambientes distintos. Por un lado, una región subtropical como Riachuelo (menor latitud) donde se analizó *P. notatum* y en otra templada como Zavalla (mayor latitud) *P. dilatatum*.

La diversidad de géneros endofitos identificados correspondió a un total de 7 en la zona subtropical y 6 géneros en la región templada, siendo levemente inferior en esta última. En cuanto al porcentaje de aislamientos (número de aislamientos/total de plantas analizadas \*100) de *P. notatum* en la zona subtropical correspondió al 52% mientras que en la zona templada *P. dilatatum* obtuvo el 37%. El porcentaje de infección endofita en plantas (E+) fue del 46,43% y 36,67% respectivamente (Tabla 2). Es de esperar obtener infección endofita en estas especies ya que se postula que las gramíneas del género *Paspalum* han coevolucionado con especies endofitas (White, 1988). Parece existir un efecto del clima sobre el número de aislamientos e infección dado que estos parámetros fueron menores en la zona templada.

Estos resultados son consistentes con lo hallado en estudios similares. El número de aislamientos y los índices de diversidad de endofitos Xylariaceos fueron generalmente más altos en climas más cálidos que en climas más fríos, lo que sugiere un gradiente climático de incidencia y diversidad de hongos endofíticos (Ikeda *et al.*, 2014). Consistente con los reportes de Arnold y Lutzoni (2007) quienes informaron que la incidencia y diversidad de los ensamblajes endofíticos generalmente aumentaron de sitios árticos a tropicales en América del Norte. Los factores causales responsables de la supuesta mayor diversidad de endofitos en lugares más cálidos siguen sin estar claros. Una posible explicación es la temperatura más baja en regiones más frías, especialmente durante el invierno. Estas bajas temperaturas pueden restringir la actividad fúngica (Osono *et al.*, 2011b) y la distribución en lugares más fríos. De todas formas, hacen falta más estudios en gramíneas de áreas tropicales y templadas para establecer la existencia de un posible gradiente latitudinal o climático en la diversidad endofita.

*Bipolaris* y *Curvularia* incluyen especies de una gran distribución y una amplia gama de huéspedes, particularmente cereales y gramíneas (Poaceae) (Manamgoda *et al.*, 2014,

Tan *et al.*, 2016). En este estudio, estos géneros fueron los de mayor porcentaje de ocurrencia, ambos con 5,56% (Tabla 3).

En cuanto a la ocurrencia de los géneros por especie vegetal, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Bipolaris* fueron los géneros encontrados en ambas especies y regiones muestreadas (figura 6). Posiblemente esto se puede deber a los siguientes reportes: la ubicuidad de *Aspergillus* es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas y contenidos de humedad. En el caso del género *Alternaria*, contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de ambientes porque sus esporas se encuentran frecuentemente suspendidas en el aire (Leonor Carrillo, 1995). El género *Bipolaris* es ubicuo en el suelo y materia vegetal con distribución cosmopolita (Palacio A, 2009).

En *P. notatum*, los de mayor porcentaje de ocurrencia fueron *Curvularia* 9,52% y *Aspergillus* 5,95% (Figura 7). *Curvularia* es un hongo donde la mayoría de las especies se encuentran en áreas tropicales o subtropicales (Knutson y Kirkbride, 1992; St-Germain y Summerbell, 1996). Las temperaturas óptimas para el crecimiento de *Curvularia* están en el rango óptimo de 20 a 35 °C (Freire *et al.*, 1998; Hassikou *et al.*, 2003; Almaguer *et al.*, 2013). *Aspergillus* tiene capacidad para crecer a diferentes temperaturas y contenidos de humedad, siendo su óptimo para la mayoría de las especies, de 30 a 33 °C (Leonor Carrillo, 1995). Estos reportes podrían explicar los motivos de su alta ocurrencia en *P. notatum*, ya que estas características coinciden con las del momento y sitio de muestreo.

En *P. dilatatum*, los de mayor porcentaje de ocurrencia fueron *Acremonium*, *Alternaria* y *Bipolaris* todos con 6,67% (Figura 7). Posiblemente, las características asociadas a la gran cantidad de especies y la distribución cosmopolita de *Alternaria* (Leonor Carrillo, 1995), *Bipolaris* (Palacio A, 2009) con sus requerimientos térmicos óptimos de 25 a 35 °C (Almaguer *et al.*, 2013), sean las causas de que se hayan encontrado en altos porcentajes en la zona muestreada. La presencia de distintas especies del género *Acremonium* en plantas de *Paspalum* en la zona templada fue reportado previamente contribuyendo al listado de los reportes de endofitos del orden Hypocreales en zonas templadas (García Lemos *et al.*, 2017)

Por otro lado, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Cercospora* y *Penicillium* fueron hallados solo en *P. notatum*, y *Acremonium*, *Cladosporium* y *Fusarium* solo en *P. dilatatum*, todos con menores porcentajes que los anteriormente mencionados (Figura 7). Esperábamos obtener un alto porcentaje de ocurrencia (mayor al 10%), ya que ha sido postulado que los pastos de este género han evolucionado conjuntamente con especies endofíticas (White, 1988). Curiosamente, la incidencia de infección fue bastante baja, menos del 10% para todos excepto la categoría no identificada y no se encontraron miembros Clavicipitaceos (el grupo

que comúnmente muestra efectos beneficiosos sobre los pastos). Parece ser que *Paspalum* se halla en pastizales de Argentina con baja frecuencia de infección por hongos endofitos. Los endofitos han sido asociado con efectos negativos en los animales, incluida la baja preferencia del forraje (Jones *et al.*, 2000), posiblemente debería esperarse una frecuencia mayor si los identificados estuvieran relacionados con el rechazo en ecosistemas de pastoreo a largo plazo. Gundel *et al.* (2013), declararon que los beneficios de la interacción endofito planta, parecen ser altamente dependientes del cultivo hospedante, la cepa endofítica y las condiciones ambientales. Quizás, la baja frecuencia de la infección de endofitos en los pastizales observada en el presente estudio, sea consecuencia de las condiciones ambientales.

---

## DIVERSIDAD ENDOFITA EN DISTINTOS MOMENTOS FENOLÓGICOS

En *P. dilatatum*, los mayores valores de porcentaje de ocurrencia se observaron en estado vegetativo para las categorías: no identificados (16%), *Bipolaris* (10,8%) y *Alternaria* (8,1%) (Tabla 5). Incluso, *Bipolaris* fue encontrado únicamente en este momento fenológico. El porcentaje de infección en vegetativo fue el más alto con 43,24% y en cuanto a la diversidad también fue mayor ya que se identificaron los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*, junto con los no identificados que fueron 6 aislamientos distintos (Tabla 5).

En estado reproductivo no se reportaron aislamientos no identificados, quedando aislados organismos de los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium*, contribuyendo a una diversidad de 5 géneros endofitos. El porcentaje de infección fue de 26% y el de ocurrencia de los géneros fue menor al 8,7% (Tabla 5). Si bien existen muy pocos reportes sobre la variación de las comunidades endofitas en diferentes estadios fenológicos de los pastos, Ghimire *et al.*, (2011), realizaron un estudio para explorar comunidades de endofitos fúngicos que habitan en plantas nativas de *Panicum virgatum* L., en praderas del norte de Oklahoma. El objetivo fue aislar endofitos en cultivo puro a partir de tejidos vegetales esterilizados superficialmente y proporcionar identificaciones taxonómicas basadas en análisis comparativos de secuencias de genes ITS. Recolectaron muestras de plantas en las primeras etapas vegetativas, reproductivas y de senescencia. Hallaron resultados similares a los de esta investigación en *P. dilatatum* y plantearon que una posibilidad para esta diferencia puede ser que los tejidos foliares de las plantas en estadios avanzados o de pasto senescente o pre-senescente tienen un contenido de nutrientes sustancialmente menor (Yang *et al.*, 2009), lo que podría ser menos apto para el crecimiento endofítico. Además, la disminución de la temperatura ambiente hacia el final de

la temporada de crecimiento podría tener un impacto negativo en el crecimiento y/o mantenimiento de varios hongos endofíticos en los tejidos foliares (Ghimire *et al.*, 2011).

En *P. notatum*, se dio la situación inversa. En estado reproductivo se encontraron los valores más importantes en porcentajes de ocurrencia y hubo 5 plantas con 2 aislamientos por planta. El género *Curvularia* obtuvo un 33% al igual que los no identificados (Tabla 6). *Curvularia* fue hallado únicamente en este momento fenológico y con una elevada ocurrencia y diversidad para lo que se ha manifestado en este estudio en especies de *Paspalum*. Además, en reproductivo también se obtuvo el mayor porcentaje de infección con un valor de 62,5% comparado con un 40% en vegetativo (Tabla 6), consecuencia de los altos valores de ocurrencia de *Curvularia*. Dado que este género parece ser el principal causante de las diferencias con el estado vegetativo, centraremos las especulaciones en sus características. *Curvularia* es un hongo filamentoso dematiaceo, donde la mayoría de las especies se encuentran en áreas tropicales o subtropicales, mientras que los pocos restantes se hallan en zonas templadas (Knudtson y Kirkbride, 1992; St-Germain y Summerbell, 1996). Podría ser este el motivo por el cual fue solo encontrado en *P. notatum*, ya que el sitio de muestreo correspondió a una zona subtropical.

Por otro lado, el contenido celular es más alto en el tejido de forraje en crecimiento activo y declina conforme las plantas maduran, aumentando la pared celular en grosor y contenido de fibra (hemicelulosa, celulosa y lignina) (Lyons *et al.*, 1999). Los hongos del género *Curvularia* requieren especialmente de celulosa como sustrato para su desarrollo, principalmente para la esporulación (Pratt, 2006). Quizás el elevado porcentaje de ocurrencia de *Curvularia* en estado reproductivo, se encuentre asociado al aumento del contenido de celulosa que se desencadena con el avance en la ontogenia del cultivo y a la región tropical/subtropical.

---

## DIVERSIDAD ENDOFITA EN DIFERENTES ECOSISTEMAS

En la localidad de Riachuelo, se tomaron muestras en 3 áreas con vegetación diferente, lo cual indica que los ambientes son distintos. Estas áreas correspondían a una pradera (A) y dos sabanas arboladas, una con dominancia de Timbó (B) y otra de Quebracho colorado (C). El porcentaje de infección endofita (E+) en los pastos analizados fue del 50%, 42,86% y 46,43% y la diversidad de géneros identificados fue de 5, 3 y 6 respectivamente (Figura 9).

En cuanto a los porcentajes de ocurrencia de los géneros endofitos, lo más llamativo fue para *Bipolaris*, obteniendo un porcentaje de 14,3% únicamente en la zona de pradera (Figura 9). Lo opuesto se dio para *Aspergillus* y *Curvularia*, los cuales mantuvieron un

porcentaje más estable a lo largo de las zonas evaluadas (Figura 9). Almaguer *et al.*, (2013) establecen que las temperaturas óptimas para el crecimiento de *Curvularia* varían de 20 a 35 °C, mientras que para *Bipolaris* el rango óptimo es mayor, de 25 a 35 °C. Freire *et al.*, (1998) y Hassikou *et al.*, (2003) han reportado similares resultados. Probablemente *Curvularia*, al poseer un rango más amplio de temperaturas (Almaguer *et al.*, 2013) y *Aspergillus* con capacidad para crecer a diferentes temperaturas y contenidos de humedad (Leonor Carrillo, 1995), sean las características que permitan a estos géneros estar presente en todas las zonas muestreadas. Es posible que la ocurrencia de *Bipolaris* únicamente en la zona de pradera esté relacionada con sus requerimientos térmicos más acotados.

En base a los resultados descritos en este capítulo, se logró alcanzar el objetivo específico planteado inicialmente, obteniendo resultados que permiten aceptar la hipótesis 1: "Existen asociaciones simbióticas de distintas especies de hongos endofitos con especies forrajeras del género *Paspalum*". Sin embargo, este estudio ha demostrado que *Paspalum* es hospedante de numerosos géneros de hongos endofíticos pero en baja frecuencia, incluido *Trichoderma sp.* que no ha sido reportado previamente en Argentina.

## CONCLUSIONES

- El objetivo planteado fue alcanzado exitosamente, pudiéndose aislar e identificar taxonómicamente hongos endofitos en *P. notatum* y *P. dilatatum*.
- La hipótesis 1: “Existen asociaciones simbióticas de distintas especies de hongos endofitos con especies forrajeras del género *Paspalum*” fue aceptada.
- *Paspalum* es hospedante de numerosos hongos endofíticos pertenecientes a más de diez géneros, pero con bajo porcentaje de incidencia, menor al 10%.
- El género *Trichoderma sp.* no se ha informado previamente como endofito aéreo en estas gramíneas de *Paspalum* en Argentina.
- Los endofitos aislados, son conocidos como *No Clavicipitaceos* clase 3, son los endofitos fúngicos más comunes restringidos a los tejidos aéreos, forman infecciones locales y se transmiten horizontalmente.
- Parece existir un efecto del clima sobre el número de aislamientos e infección dado que estos parámetros fueron menores en la zona templada.
- Es posible que la ocurrencia de *Bipolaris* únicamente en la zona de pradera esté relacionada con sus requerimientos térmicos más estrictos.
- Posiblemente tanto *Curvularia sp.* como *Aspergillus sp.*, dado que poseen capacidad para crecer en diferentes ambientes, hayan estado presentes en todas las zonas muestreadas con diferencias en la vegetación.



## BIBLIOGRAFÍA

Almaguer, M., Rojas, T.I., Dobal, V., Batista, A., Aira, M.J. (2013). Effect of temperature on growth and germination of conidia in *Curvularia* and *Bipolaris* species isolated from the air. *Aerobiologia*, 29:13–20 DOI 10.1007/s10453-012-9257-z

Altieri M and Nicholls C (1999). Biodiversity and pest Management in Agroecosystems, Haworth Press, USA. 256pp.

Anjos, J. R. N., Charchar, M. J. A., Teixeira, R. N., & Anjos, S. S. N. (2004). Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (6), 656–658. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582004000600010>

Amend AS, Seifert KA, Samson R, Bruns TD (2010) Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13748–13753

Arias GG, Mesa L, Novo Z, Vilardel G, Manes D, Areces, Granda A, Gutiérrez RG, González FL, Zayas A, Ramos A, González M, Guardado M, Guevara I, Albanés C, Rivero G, Sánchez C, Buchillón C, López M (2006). Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad*, 10: 11-18.

ARNOLD AE, MAYNARD Z, GILBERT GS, COLEY PD, KURSAR TA. 2000. Are Tropical Fungal Endophytes Hyperdiverse? *Ecol Lett.* 2000;3:267-274.

Arnold AE, Herre EA. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388-398.

Arnold E y Lutzoni F (2007). DIVERSITY AND HOST RANGE OF FOLIAR FUNGAL ENDOPHYTES: ARE TROPICAL LEAVES BIODIVERSITY HOTSPOTS?. *Ecology*, 88(3) 541–549

Bensch, K., Braun, U., Groenewald, JZ., Crous, PW. 2013. The genus *Cladosporium* Studies in Mycology 72:1-401.

Bertín OD (2009). Diagnóstico y Prospectivas de los Forrajes y Pasturas En Argentina. *Producir XXI*, 211: 16-20.

Bischoff JF, White JF Jr 2005. Evolutionary development of the Clavicipitaceae. In: Dighton J, White JF, Oudemans P, eds. The fungal community: Its organization and role in the ecosystem. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, 505-518.

Braun, U., Crous, P.W., Nakashima, Ch. 2015. Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 3. Species on monocots (Poaceae, true grasses). IMA Fungus 6(1):25-97.

Chaverri, P., Gazis, R. O., & Samuels, G. J. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. Mycologia 103(1): 139-151. <https://doi.org/10.3852/10-078>

Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology 69: 10-16.

Clay K (1998). Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: Cheplick GP. (Eds.), Population Biology of Grasses, Cambridge University Press, Cambridge. 255-285. USA. 412pp

Clay K, Schardl C, 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. American Naturalist 160: S99eS127

Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Wingfield, M.J., Summerell, B.A., Carnegie, A.J. 2017. Fungal Planet description sheets: Fungal Planet description sheets 705-20. *Cercospora dianellicola* Crous sp. nov. In: Persoonia 39:442-443.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., et al. (2008) Phylogeny.fr. Robust phylogenetic analysis for the non-specialist, Nucleic Acids Research, 36, W465–W469.

Devedee, A. K., Rakshit, A., & Kumari, R. (2020). *Trichoderma improves photosynthetic features of rajmash (Phaseolus vulgaris C. V. HUR-137) in Varanasi region of Uttar Pradesh*. 9(1), 2127–2130.

De Bary A. 1879. Die Erscheinung der Symbiose. In: Trubner KJ, ed. Vortrag aufder Versammlung der Naturforscher und Artze zu Cassel. Strassburg, Germany: Verlag, 1-30.

de Souza Sebastianes, F. L., Romão-Dumaresq, A. S., Lacava, P. T., Harakava, R., Azevedo, J. L., De Melo, I. S., & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2013). Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Current Genetics*, 59(3), 153–166. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0396-8>

Faeth SH, Gardner DR, Hayes CJ, Jani A, Wittlinger SK, Jones TA. 2006. Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. Journal of Chemical Ecology 32: 307-324.

Freire, S. V. P., Paiva, L. M., Lima, E. A. L. A., & Maia, L. C. (1998). Morphological, cytological, and cultural aspects of *Curvularia pallescens*. *Revista de Microbiologia*, 29(3), 56–59.

García Lemos A (2015). Hongos endofitos presentes en especies forrajeras de la Región Pampeana, evaluación de su potencial como agentes antagónicos y productores de metabolitos bioactivos. Tesis de Maestría en Recursos Naturales, UNR.

García Lemos A, Gil-Cardesa ML, Gómez EdV and Felitti SA. (2017). Fungal Endophytes in Species of *Paspalum* and *Bromus*, Occurrence and In Vitro Antagonistic Activity Assessment. *Research & Reviews: Research Journal of Biology*, 5:11-25

García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa Prieto MR; Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ, González-Esquivel CE. 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 58-79.

Ghimire SR, Charlton ND, Bell JD, Krishnamurthy YL& Craven KD (2011). Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity*, 47:19–27 DOI 10.1007/s13225-010-0085-6

Gundel PE, Perez LI, Helander M, Saikkonen K (2013). Symbiotically modified organisms: nontoxic fungal endophytes in grasses. TRPLSC-1049, *Trends in Plant Science*, 18:420-427. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.003>

Harman, G. E., Doni, F., Khadka, R. B., & Uphoff, N. (2019). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 1–18. <https://doi.org/10.1111/jam.14368>

Hassikou, R., Hassikou, K., Ouazzanni, A., Badoc, A., & Doura, A. (2003). Biologie, physiologie et pouvoir pathogène de quelques isolats de *Curvularia lunata* agent de la curvulariose du riz. *Bulletin de la Société Pharmaceutique de Bordeaux*, 142, 25–44.

Hillebrand H (2004) On the generality of the latitudinal diversity gradient. *Am Nat* 163:192–211

Hosokawa, M., Tanaka, C., & Tsuda, M. 2003. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. *Mycoscience* 44(3):227–237. <https://doi.org/10.1007/S10267-003-0103->

6

Ikeda A, Matsuoka S, Masuya H, Mori AS, Hirose D y Osono T (2014). Comparison of the diversity, composition, and host recurrence of xylariaceous endophytes in subtropical, cool temperate, and subboreal regions in Japan. *Popul Ecol*, 56:289–300 DOI 10.1007/s10144-013-0412-3

Iturrieta-González, I., Gené, J., Wiederhold, N., García, D. 2020. Three new *Curvularia* species from clinical and environmental sources. *Mycology* 68:1-21.

Kee, Y. J., Zakaria, L., & Mohd, M. H. 2020. *Curvularia asianensis* and *Curvularia eragrostidis* associated with leaf spot of *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Journal of Phytopathology*, 168(5), 290–296. <https://doi.org/10.1111/jph.12890>

Kleczewski, N. M., Bauer, J. T., Bever, J. D., Clay, K., & Reynolds, H. L. (2012). A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal Ecology*, 5(5), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.006>

Knudtson, W. U., and C. A. Kirkbride. 1992. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *J Vet Diagn Invest*. 4:181-5.

Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* 174: 648-657.

Kusai, N. A., Mior Zakuan Azmi, M., Zulkifly, S., Yusof, M. T., & Mohd Zainudin, N. A. I. (2016). Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Rendiconti Lincei*, 27(2), 205–214. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0458-6>

Larran, S., Simón, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. P. S., & Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, 92, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002>

Leuchtmann, A., Bacon, C. W., Schardl, C. L., White, J. F. Jr, & Tadych, M. (2014). Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106, 202–215. <https://doi.org/10.3852/13-251>

Leonor Carrillo. (1995). Los Hongos De Los Alimentos Y Forrajes: *Aspergillus*. *Official Methods of Analysis*, 49.

Lyons, R.K., R. Machen y T.D.A. Forbes. 1999. ¿POR QUE CAMBIA LA CALIDAD DEL

FORRAJE DE LOS PASTIZALES? AgriLife Extension. E-99S 7-01

Marín-Félix, Y., Hernández-Restrepo, M., Crous, P.M. 2020. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress* 19:559–588. doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6

Martínez B, Danay Infante, Yusimy Reyes 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. *Rev. Protección Veg.* 28(1):1-11.

Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H et al. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221-288. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>

Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzi, E.H.C., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. 2012. Two new *Curvularia* species from northern Thailand. *Sydowia* 64(2): 255-266.

Manamgoda, D.S.D., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Chukeatirote, K., Hyde, D. 2015. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogen. *Phytotaxa* 212:173-198

Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. 193 p. Pennsylvania State University Press, USA.

Novicki, T. J., LaFe, K., Bui, L., Bui, U., Geise, R., Marr, K., & Cookson, B. T. (2003). Genetic Diversity among Clinical Isolates of *Acremonium strictum* determined during an Investigation of a Fatal Mycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2623–2628. doi:10.1128/jcm.41.6.2623-2628.2003

Palacio A, C. M. (2009). Infecciones por hongos invasores en imágenes. In *Infecciones por hongos invasores en imágenes*.

Patle, P., Phule Krishi Vidyapeeth, M., Navnage, I. N., Krishi Vishwavidyalaya, G., Ramteke, I. P., Navnage, N., & Ramteke, P. (2018). Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. 270 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 270–274.

Pratt, R.G. Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates. *Mycopathologia* 162, 133–140 (2006). <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0043-8>

Pryor, B. M., & Michailides, T. J. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92(4), 406–416. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.4.406>

- Rajini, S. B., Nandhini, M., Udayashankar, A. C., Niranjana, S. R., Lund, O. S., & Prakash, H. S. (2020). Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of Sorghum bicolor. *Plant Pathology*, 0–1. <https://doi.org/10.1111/ppa.13151>
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Saikkonen K, Faeth S, Helander M, Sullivan T (1998). Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 29: 319- 343.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.h.W., Perrone, G., Seifert, K.A., . Susca, A., Tanney, J.B., J. Varga, J.B.T., Kocsub,s., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the *genus Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141-173.
- Sánchez Marquez, S., Bills, G. F., García Criado, B., & Zabalgoceazcoa, I. (2004). *Hongos asociados a gramíneas silvestres de pastos naturales*. *Pastos y Ganadería Extensiva*: 163-166
- St-Germain, G., and R. Summerbell. 1996. *Identifying Filamentous Fungi – A Clinical Laboratory Handbook*, 1st ed. Star Publishing Company, Belmont, California.
- Stone JK, PolishookJD, White JRJ. 2004. Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills GF, Foster MS, eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, USA: Elsevier, 241-270.
- R.C., Gueidan, C., Schroers, H.J., Hoog, G.S. de., Starink, Arocha Rosete, Y., Guarro, J., Scott, J.A. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* 68:139-162.
- Tan, YP., Crous, PW., Shivas, RG. 2018. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys* 35:1-25
- Tan YP, Crous PW, Shivas RG. 2016 – Eight novel Bipolaris species identified from John L. Alcorn’s collections at the Queensland Plant Pathology Herbarium (BRIP). *Mycological Progress* 15, 1203–1214.
- Tasić, S., & Miladinović-Tasić, N. (2007). *Cladosporium* spp.: Cause of opportunistic mycoses. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 24(1), 15–19.

Tessmann, D. J., Charudattan, R., Kistler, H. C., & Roskopf, E. N. 2001. A Molecular Characterization of *Cercospora* Species Pathogenic to Water Hyacinth and Emendation of *C. piaropi*. *Mycologia*, 93(2), 323. doi:10.2307/3761654

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, S.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78:343-371.

Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Second Edition. CRC PRESS, 506 p.

Woudenberg, J.H., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. *Stud Mycol* 75:171-212.

Woudenberg, J.H., Seidl, M.F., Groenewald, J.Z., de Vries, M., Stielow, J.B., Thomma, B.P., Crous, P.W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes? *Stud Mycol* 82:1-21

Yang JD, Worley E, Wang MY, Lahner B, Salt DE, Saha M, Udvardi M (2009) Natural variation for nutrient use and remobilization efficiencies in switchgrass. *Bioenerg Res* 2:257–266



### **CAPITULO III: ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA INTERACCIÓN ENDOFITO-PATÓGENO**

#### **OBJETIVO ESPECÍFICO 2**

**Evaluación de la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades de *Paspalum*, probando su efecto antagónico contra fitopatógenos mediante pruebas *in vitro*.**

**Depetris, M. B.,** Acuña, C. A., Marcón, F., Gutierrez, S., Felitti, S. A. (2020). Evaluación de la capacidad de hongos endofitos como controladores de enfermedades en *Paspalum* mediante pruebas *in vitro*. **IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina.** Modalidad virtual.

## INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías aplicadas a las diferentes áreas de la agricultura han mejorado la producción agrícola, pero varias de las prácticas realizadas afectan considerablemente el medio ambiente. El desafío reciente que enfrenta la agricultura es lograr mayores rendimientos de una manera sustentable (Ghazanfar *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo de los ciclos productivos los agricultores utilizan una gran cantidad de fungicidas químicos sintéticos para el manejo de enfermedades fúngicas. El uso reiterado de estos químicos conduce a un mayor impacto ambiental negativo, con el consecuente desarrollo de cepas patógenas resistentes a los pesticidas. Además, causan serios problemas de salud en humanos y animales debido a su carcinogenicidad, teratogenicidad y toxicidad aguda (Rajini *et al.*, 2020). Por lo tanto, consideramos que existe una necesidad inmediata de encontrar soluciones a los problemas nombrados y desarrollar alternativas ecológicas a los pesticidas químicos.

El término "biocontrol o control biológico" fue introducido por primera vez en 1914 por Tubeuf y en 1919 por Smith, con especial preocupación por los patógenos de las plantas y los insectos, respectivamente. El biocontrol se refiere a la reducción en la población de plagas por organismos naturales que son parte del manejo integrado de enfermedades. El agente de biocontrol de los patógenos de las plantas conocido como antagonista, inspira el trabajo de desarrollo e investigación en muchos campos para satisfacer las necesidades de la creciente población humana mediante el manejo de plagas. Estos microorganismos antagonistas pertenecen a varios grupos de hongos y bacterias, mientras que las plagas de plantas incluyen patógenos, malezas e insectos (Ghazanfar *et al.*, 2018).

El término endofito es utilizado, actualmente, para describir a distintos organismos que en algún período de su ciclo vital habitan dentro de las plantas, en sus tejidos, sin causar daño a las mismas. La mayoría de las plantas vasculares examinadas presentan organismos endofitos asociados (Jalgaonwala *et al.*, 2011). Son un grupo de microorganismos simbióticos que viven de manera asintomática dentro de los tejidos vegetales sanos (Gamboa *et al.*, 2006).

Se sabe que los endofitos se encuentran en todas las especies de plantas y en su mayoría son hongos o bacterias. El principal interés es que producen metabolitos secundarios activos que tienen propiedades antimicrobianas. Los metabolitos secundarios producidos (en tallos, hojas y raíces) son utilizados por la planta principalmente para su propósito de supervivencia contra el estrés abiótico y biótico. También, ayudan en la resistencia a enfermedades, la conservación del agua y la mejora de la cantidad de biomasa.

Se caracterizan por ocupar nichos ecológicos en los tejidos internos vivos de sus huéspedes sin ningún efecto adverso (Leon *et al.*, 2018).

Dado que los endofitos poseen un tremendo potencial para sintetizar metabolitos, ha instaurado mucha atención en la investigación académica e industrial. Comprender la diversidad de hongos endofíticos en una planta huésped es clave para identificar los nuevos compuestos antimicrobianos específicos sintetizados. Una cuestión importante para mejorar la sustentabilidad de los sistemas productivos es que los metabolitos de los endofitos se consideran seguros, ya que muestran baja toxicidad para los humanos y animales (Rajini *et al.*, 2020).

Las gramíneas del género *Paspalum* constituyen la base forrajera de numerosas explotaciones ganaderas. Estas gramíneas, así como otras especies de plantas, establecen simbiosis con hongos que son importantes en la estructura, función y salud de las comunidades vegetales (Sánchez Márquez *et al.*, 2008).

*Paspalum dilatatum* Poir, es una gramínea perenne tropical a subtropical, con ciclo estivo otoñal, originaria de América meridional. Es conocida en Argentina como pasto miel, presenta gran importancia como forrajera, destacándose por su productividad y por la preferencia que el ganado manifiesta por ella. La difusión de esta forrajera en la siembra se ha visto dificultada por inconvenientes en la producción de semilla. Principalmente debido a la susceptibilidad al hongo *Claviceps paspali*, el cual destruye los cariopses reemplazándolos por estructuras de resistencia denominadas esclerocios (García *et al.*, 2001).

*Paspalum notatum* Flüggé, es valorada por su forma de estabilizadora de erosión, por su facilidad de establecerse y persistencia, además, presenta un mantenimiento relativamente bajo, con pocas enfermedades y problemas de insectos. Dadas sus características de resistencia, es usada como pastura para ganados y como pasto de jardín (Clayton *et al.*, 2006).

Existe evidencia de la presencia de hongos endofitos en algunas especies del género *Paspalum* (Sánchez Márquez *et al.*, 2008). García Lemos *et al.*, (2017), estudiaron la presencia de hongos endofitos en plantas forrajeras de *P. dilatatum*, *P. notatum*, *Bromus catharticus*, *B. biebersteinii*, *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum*, en las localidades de Zavalla y Funes, en el sur de la provincia de Santa Fe. Los principales taxa de hongos aislados pertenecieron a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Sthephyllium*. Se evaluó el efecto antagónico de cepas aisladas del género *Acremonium* frente a aislados fúngicos patógenos. *Acremonium* sp3. presentó la

mayor actividad antagónica mostrando un 91,42% y 91,35% de porcentaje de inhibición de crecimiento frente a *Alternaria alternata* y a *Alternaria sp.*, respectivamente. Este fue el primer reporte de especies del género *Acremonium* asociadas a *P. dilatatum* y *P. notatum* en el país, aunque carece de evaluaciones referidas a la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades en planta y mediciones de parámetros agronómicos en plantas infectadas y no infectadas con hongos endofitos, que sí se plantearon en esta tesis.

En este estudio, se evaluaron 2 cepas endofíticas correspondientes a *Trichoderma amazonicum* Rifai y *Acremonium strictum* W. Gams., siendo las especies más frecuentes con potencial antagonista en *Paspalum notatum* y *P. dilatatum* respectivamente. Esta selección se basó en los antecedentes detallados a continuación.

---

## ANTECEDENTES DE ESPECIES UTILIZADAS COMO ANTAGONISTAS

Entre los diversos tipos de especies que se utilizan como agentes de biocontrol, *Trichoderma* se usa ampliamente contra diferentes tipos de patógenos de plantas. *Trichoderma spp.* son hongos asexuales que están presentes en todo tipo de suelos agrícolas, como endofito y en madera en descomposición. La actividad hostil de las especies de *Trichoderma* mostró que es parásita de muchos patógenos foliares de plantas y de suelo. Estudios recientes mostraron que este hongo no solo actúa como agente de biocontrol sino que también estimula la resistencia, el crecimiento y el desarrollo de las plantas, lo que resulta en un aumento en la producción de cultivos. La actividad antagónica involucra micoparasitismo, producción de antibióticos, competencia por nutrientes e inducción de resistencia sistémica en las plantas. Actualmente, *Trichoderma spp.* se utiliza para controlar las enfermedades de las plantas en el sistema de gestión sostenible de enfermedades (Ghazanfar *et al.*, 2018).

Las especies del género *Trichoderma* poseen crecimiento rápido en un rango óptimo entre 25-30°C (Latifian *et al.*, 2007). Utilizan una variedad de compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno como medio de crecimiento para su esporulación (Gao *et al.*, 2007; Seyis y Aksoz, 2005) y los esporulados de *Trichoderma* producen abundantemente masas de polvo caracterizado por conidios verdes (Chaudhari *et al.*, 2011).

Castro Toro y Rivillas Osorio (2012) describieron tres mecanismos involucrados en el biocontrol de patógenos por parte de *Trichoderma*:

- Micoparasitismo: proceso por el cual la hifa de *Trichoderma* entra en contacto con la hifa del hongo patógeno, comienza a crecer alrededor de la misma y por acción de enzimas líticas (glucanasas, celulasas, quitinasas, entre otras) degradan la hifa patógena. Posteriormente, el hongo antagonista penetra la hifa provocando

degradación celular, rompimiento hifal y destrucción total de la hifa del patógeno.

- Antibiosis: producción de antibióticos (algunos son harzianolida, alameticina, tricolina) que juegan un papel importante como inhibidores en el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. El nivel de antagonismo frente a patógenos es alto con la combinación de enzimas líticas y antibióticos.
- Competencia: en la competencia por espacio o nutrientes, *Trichoderma* posee una alta tasa de desarrollo y una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes.

En Argentina, Larran *et al.* (2015) realizaron un estudio de hongos endofitos en plantas de trigo, como agentes de biocontrol contra fitopatógenos; entre éstos, *T. hamatum* redujo el tamaño de las colonias de los patógenos de manera significativa.

Por otro lado, *Acremonium spp.* posee cualidades favorables que lo ubican como un buen agente para el control de enfermedades causadas por patógenos fúngicos en plantas, entre ellas, la capacidad de sintetizar sustancias antibióticas (compuestos alcaloides, metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas) y mecanismos de acción (como el micoparasitismo y competencia por nutrientes). Sin embargo, este género se encuentra entre los taxones menos estudiados (Gams *et al.*, 2004). Al respecto, García Lemos *et al.* (2017) demostraron que cepas diferentes de *Acremonium sp.* tuvieron un gran efecto antagonista contra *Alternaria alternata*, patógeno foliar común en plantas forrajeras; en tanto Gams *et al.*, (2004), determinaron que *A. strictum*, es un hongo cosmopolita, que puede parasitar a muchos hongos saprófitos y varios hongos fitopatógenos; es una especie que posee una gran diversidad genética y puede ser encontrado como patógeno en diversas especies, como por ejemplo en maíz (Tagne *et al.*, 2002).

Según diferentes reportes bibliográficos sobre este género, se encontró actividad antifúngica contra los siguientes patógenos: pudrición blanda por *Pythium myriotylum* Drechsler (Anisha y Radhakrishnan, 2015), *Fusarium* y *Colletotrichum* (El-Deeb y Arab, 2013; Prathyusha *et al.*, 2015), piriculariosis por *Magnaporthe grisea* Barr. en arroz (Atugala y Deshappriya, 2015), pudrición del tallo causada por *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (Chowdhary y Kaushik 2018), entre otros.

Los estudios de Wicklow *et al.* (2005) evidenciaron que la actividad antimicrobiana de *A. zeae* Gams, es debida a la producción de pyrrocidinas, componentes que parecen aumentar las defensas de la planta frente a patógenos fúngicos y bacterianos (Wicklow *et al.*, 2005; Sánchez Márquez *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta las características farmacológicas y en particular, las habilidades

de organismos antagonistas, estas especies fueron evaluadas como biocontroladores.

---

## ANTECEDENTES DE ESPECIES UTILIZADAS COMO PATÓGENOS

Las cepas identificadas como: *Alternaria alternata*, *Bipolaris sp.* y *Claviceps paspali* fueron utilizadas como patógenas por su importancia en las pérdidas de rendimiento (Anjos *et al.*, 2004; Blount y Acuña 2009; Pazos *et al.*, 2011; García León *et al.*, 2013; Ríos *et al.*, 2015; Mata Santoyo *et al.*, 2018).

En cultivos de avena y trigo, los agentes causales de tizones foliares son hongos dematiáceos pertenecientes a los géneros *Alternaria sp.* y *Bipolaris spp.*, ocasionando grandes pérdidas de rendimientos (García León *et al.*, 2013, Mata Santoyo *et al.*, 2018).

El género *Bipolaris* Shoemaker fue indicado como hongo patógeno en las siguientes plantas cultivadas: *Paspalum atratum cv. Pojuca*, maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), entre otras, dando como resultado la infección de todas las especies de gramíneas al ser inoculadas con *B. maydis* en las hojas y en las semillas (Anjos *et al.*, 2004).

Pazos *et al.* (2011) evaluaron la incidencia de hongos fitopatógenos y la germinación en semillas de las principales especies forrajeras tropicales utilizadas en Paraguay, hallando presente a *Alternaria sp.* como patógeno. La especie *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, ha sido aislada de plantas enfermas de *Paspalum dilatatum* en la provincia de Santa Fe (García Lemos *et al.*, 2017).

El cornezuelo causado por *Claviceps paspali* F. Stevens y J.G. Hall reduce la calidad de la semilla de ciertos cultivares de *P. notatum*, principalmente de genotipos tetraploides (Burton, 1955, Acuña *et al.*, 2007). Esto limita el suministro de semillas, aumentando los costos de implantación y afectando el stand de plantas. El alto rendimiento y la calidad de las semillas en el pasto bahía se ven limitados por la enfermedad del cornezuelo (Burton y Lefebvre 1948; Burton, 1955; Blount y Acuña 2009; Ríos *et al.*, 2015). Por otro lado, la difusión de *P. dilatatum* en la siembra se ha visto también dificultada por inconvenientes en la producción de semilla, debido a la susceptibilidad que presenta a este hongo, el cual destruye los cariopses reemplazándolos por esclerocios (García *et al.*, 2001); este hongo produce azúcares exudados que atraen a polillas que son vectores de varios fitopatógenos del género *Fusarium*, que suprimirían la acción del mismo. Sin embargo, existen otros hongos endofitos encontrados a nivel foliar (*Ampelomyces*, *Curvularia*, *Bipolaris*, etc.), los cuales podrían promover, aparentemente, la defensa del huésped contra *C. paspali* (Feldman *et al.*, 2008).

En base a los resultados obtenidos sobre la diversidad de hongos endofitos en *P. dilatatum* y *P. notatum* (Objetivo específico 1, Capítulo II) y los antecedentes de patógenos y antagonistas citados anteriormente, se continuaron los análisis posteriores.

En este caso, el objetivo específico 2, consistió en: “*Evaluación de la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades en Paspalum, probando su efecto antagónico contra fitopatógenos mediante pruebas in vitro*”.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 2 cepas endofíticas correspondientes a *Trichoderma amazonicum* y *Acremonium strictum* siendo las especies más frecuentes con potencial antagonista en *P. notatum* y *P. dilatatum* respectivamente. Las cepas identificadas como: *Alternaria alternata*, *Bipolaris sp.* y *Claviceps paspali* fueron evaluadas como patógenas.

### EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO POR CULTIVO DOBLE

La evaluación del desarrollo simultáneo del microorganismo patógeno y del potencial antagonista fue realizado mediante la técnica de enfrentamiento dual (Živković *et al.*, 2010) en medio PDA. Esto permitió el análisis *in vitro* de la interacción endofito-patógeno (Fokkema, 1978).

Las dos cepas, patógena y endofita no patógena, se sembraron una enfrente a la otra en la misma placa de Petri, a la máxima distancia entre sí y a 2 cm del borde (cultivo dual), por triplicado. Las mismas se incubaron a 28 °C durante de 15 días para *A. strictum* y 7 días para *T. amazonicum*. La diferencia en los días de cultivo para cada especie radica en su velocidad de crecimiento. A su vez, los controles utilizados consistieron en el cultivo puro de los patógenos creciendo bajo las mismas condiciones que los cultivos duales. Se llevó registro fotográfico y medición del diámetro de la colonia a los 7 y 15 días de inoculación, también la presencia o ausencia de halo inhibitorio. Se calculó el porcentaje de inhibición a través de la medición del crecimiento radial de cada hongo en cultivo doble por triplicado.

El porcentaje de inhibición y antagonismo (PGI – sigla del inglés *Percentage Growth Inhibition*), se calculó por la fórmula de Skidmore y Dickinson, (1976):

**PGI (%)**:  $KR - R1 / KR \times 100$ , donde:

KR: radio del patógeno desde el centro del punto de inoculación hacia el borde de la colonia en el cultivo control.

R1: radio del patógeno desde el centro del punto de inoculación hacia el borde de la colonia en dirección a la colonia antagonista en el cultivo doble.

Los porcentajes de inhibición (PGI) fueron categorizados de acuerdo a las categorías de inhibición del crecimiento (**CIC**) de Živković *et al.* (2010) donde:

0 = no existe inhibición del crecimiento del patógeno.

1 = 1-25% de inhibición del crecimiento del patógeno; Débil.

2 = 26-50% de inhibición del crecimiento del patógeno; Moderada.

3 = 51-75% de inhibición del crecimiento del patógeno; Fuerte.

4 = 76-100% de inhibición del crecimiento del patógeno; Muy fuerte.

Además, se registró la zona de inhibición en los cultivos dobles como la distancia en milímetros entre el hongo patógeno y el hongo antagonista después de 7 días de crecimiento.

Estas zonas fueron caracterizadas como:

- no hay zona de inhibición;

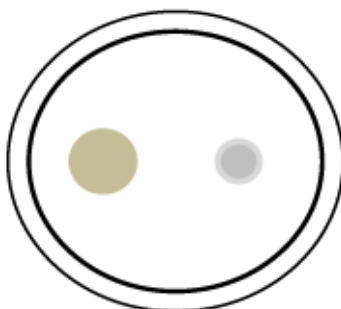
+ (muy débil): 0-5 mm;

++ (débil): 6-10 mm;

+++ (moderada): 11-15 mm;

++++ (fuerte): 16-20 mm;

+++++ (muy fuerte): > 2 cm.



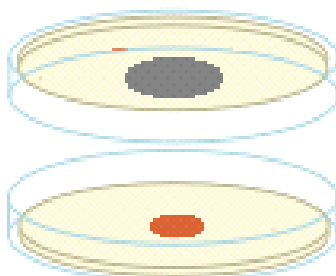
**Figura 10.** Esquema representativo de un cultivo doble en una placa de Petri donde dos colonias (una patógena y otra antagonista) son enfrentadas. Fuente: García Lemos, A. (2015).

---

## EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO POR PRODUCCIÓN DE METABOLITOS VOLÁTILES

En placas de Petri de 90 mm de diámetro se añadió medio de cultivo PDA, una con un disco de micelio del patógeno y otra con micelio del antagonista. Se colocaron una frente a la otra bajo cámara de flujo laminar y se sellaron con Parafilm (Dennis y Webster, 1971; Acosta Suarez *et al.*, 2013). Las placas se incubaron a 28°C durante siete días. Se llevó registro fotográfico y medición del diámetro de la colonia a los 7 días de inoculación dado

que a mayor duración del experimento se contaminaban los tratamientos por la superposición. Calculamos así, el porcentaje de inhibición (PGI) y categoría de inhibición del crecimiento (CIC), que ejerció el antagonista sobre el patógeno comparado con el patógeno en cultivo puro (testigo en ausencia de volátiles).



**Figura 11.** Esquema representativo de un cultivo con superposición de placas de Petri, donde dos colonias (una patógena y otra antagonista) son enfrentadas por metabolitos volátiles. Fuente: Autor.

---

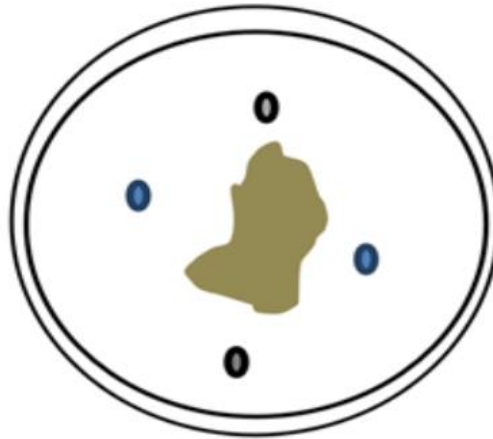
## EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO POR TÉCNICA DE EXCAVACIÓN-PLACA CULTIVO

Para la evaluación del potencial antagonismo de los endofitos seleccionados sobre la enfermedad causada por el hongo *C. paspali* (ergot), se cosecharon inflorescencias con síntomas de la enfermedad. Las flores colectadas mostraron el exudado mucilaginoso y viscoso característico de ergot, que atrae a los insectos favoreciendo su dispersión. Esta metodología fue seleccionada dado que los microorganismos del género *Claviceps* son biótropos (Mey *et al.*, 2002) y no pueden ser cultivados *in vitro*.

Inóculo: Una cantidad de 35 espiguillas con las secreciones descritas, fueron separadas del resto mediante el uso de un bisturí sobre papel de filtro estériles. El material infectado se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml al que se le agregaron 1000 µl de agua destilada estéril. Se realizó una agitación manual y mediante el uso de una gasa estéril se trasvasó a un tubo limpio. Finalmente, se agregó una gota de Tween 20 y esto fue utilizado como inóculo de ergot.

Excavación-placa cultivo: Para esto se utilizaron placas con cultivos puros de los antagonistas en medio PDA, de 7 días de crecimiento para *A. strictum* y 3 días para *T. amazonicum*. La diferencia en los días de cultivo para cada especie, radica en su velocidad de crecimiento, ambos antagonistas fueron intervenidos (excavación) cuando su colonia ocupó el centro de la placa con aproximadamente 3 cm de diámetro, entendiéndose como

colonias establecidas. Se realizaron 4 huecos de 5 milímetros por placa de Petri (en cámara de flujo), utilizando como sacabocados la base de un tip autoclavado (Figura 12). Dentro de cada hueco, se colocaron 20  $\mu$ l del inóculo de ergot y se hicieron 3 réplicas por antagonista a evaluar.



**Figura 12.** Esquema representativo de la técnica excavación - placa cultivo. Los círculos pequeños representan los huecos formados en el medio PDA que contienen inóculo a probar contra la colonia antagonista. Fuente: Autor.

Evaluación: Se realizó el seguimiento de los cultivos observando si la colonia detenía su crecimiento en algún lado cercano a los huecos con inóculo, así como la presencia o ausencia de halo de inhibición formado alrededor de los mismos, siendo la presencia de este, una señal de la propiedad antibiótica o anti-fúngica (Okeke *et al.*, 1994).

**i. Análisis de datos:**

Los datos de PGI fueron analizados mediante ANOVA de dos factores. Se consideraron los efectos fijos de antagonista y patógeno y la interacción entre ellos. La prueba de normalidad de los residuales del modelo se realizó a través del test de Shapiro-Wilks. La homogeneidad de variancias fue analizada mediante la prueba de Bartlett. Los valores medios fueron comparados utilizando la prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD) utilizando el paquete agricolae del programa R.

## RESULTADOS

### PRUEBA DE ANTAGONISMO – CULTIVO DOBLE

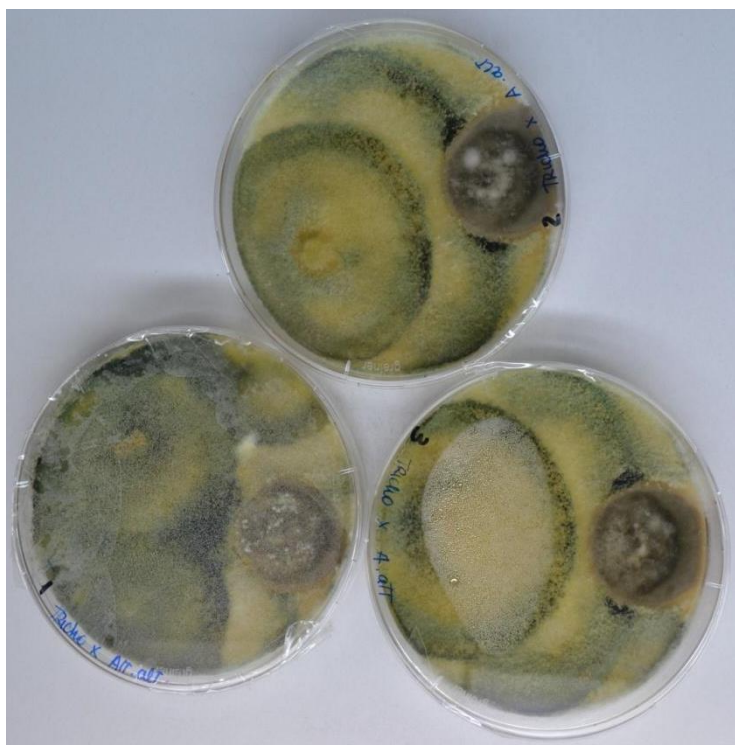
Dado que las especies del género *Trichoderma* son de muy rápido crecimiento, su análisis fue realizado durante una semana, mientras que *Acremonium* se evaluó durante 15 días por ser un género de crecimiento más lento.

**Tabla 7.** Porcentaje de Inhibición del crecimiento (PGI) y Categoría de inhibición del crecimiento (CIC) por enfrentamiento dual:

Enfrentamiento dual	<i>Alternaria alternata</i>			<i>Bipolaris sp.</i>		
	PGI%	CIC	Zona inhibición (mm)	PGI%	CIC	mm
<i>Trichoderma amazonicum</i>	66,18	3	-	60,32	3	-
<i>Acremonium strictum</i>	34,12	2	Lateral colonia roja	22,99	1	8

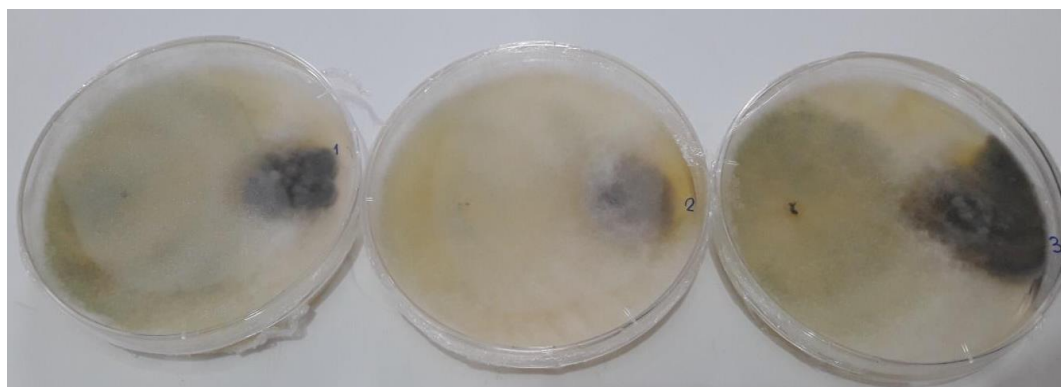
A) *Trichoderma amazonicum* cubrió las colonias patógenas a los 7 días de crecimiento con diferencias en el porcentaje y categoría de inhibición del crecimiento según la especie.

En la figura 13, se puede observar que la cepa de *T. amazonicum* no posee zona de inhibición para *A. alternata* cubriendo al patógeno a los 7 días de cultivo. El PGI fue el mayor alcanzando un valor de 66,18% y correspondiente a la categoría (CIC) 3, considerándose como fuerte su capacidad de inhibición del patógeno.



**Figura 13.** Enfrentamiento en placa de *T. amazonicum* (a la izquierda de la placa, color verde con anillos verde oscuro) contra *A. alternata* (a la derecha de la placa, color marrón a negro), luego de 7 días de crecimiento y por triplicado.

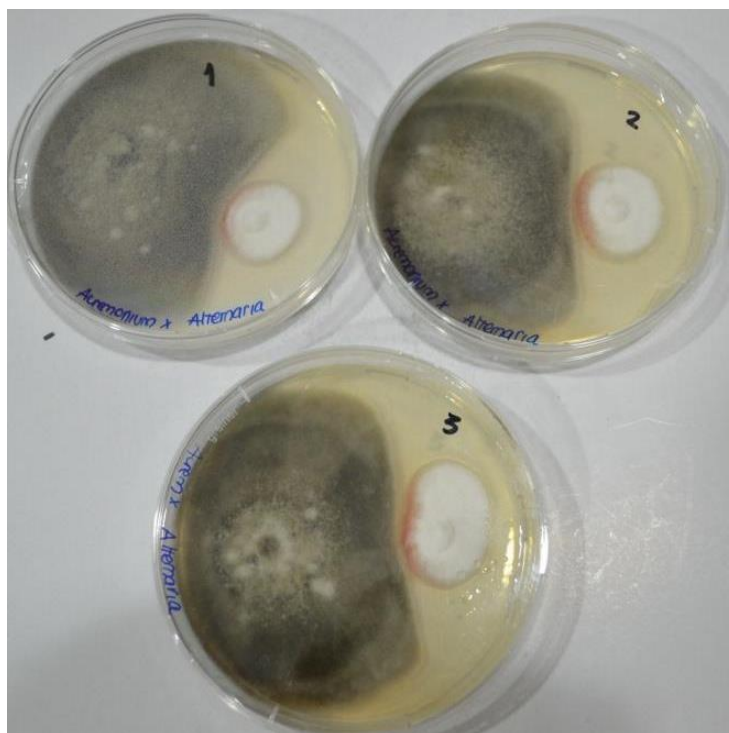
En el enfrentamiento dual contra *Bipolaris sp.*, la cepa de *T. amazonicum* cubrió gran parte de la colonia del patógeno a la semana de crecimiento (Figura 14). Su PGI de 60,32%, fue levemente inferior al encontrado frente a *A. alternata*, mostrando *T. amazonicum* la misma categoría (CIC 3) de inhibición para ambos patógenos analizados.



**Figura 14.** *T. amazonicum* (a la izquierda de la placa) cubriendo la colonia de *Bipolaris sp.* (a la derecha, color oscuro), luego de 7 días de crecimiento y por triplicado.



- B) *A. strictum* a los 15 días de crecimiento generó en un lateral de la colonia una coloración rojiza en dirección al patógeno *A. alternata*, el PGI fue de 34,12% y el CIC de 2 lo que corresponde a una categoría de inhibición moderada (Figura 15).



**Figura 15.** Enfrentamiento dual entre *A. strictum* (a la derecha de la placa, colonia blanca algodonosa) y *A. alternata* (a la izquierda, colonia color oscuro) a los 14 días de crecimiento.

Se analizó una muestra de la región de color rojiza de la colonia de *A. strictum*, en el microscopio óptico 63x, visualizándose hifas y conidios de *A. alternata* creciendo de derecha a izquierda en dirección a la colonia de *A. strictum*. Dicha coloración podría deberse a la interacción entre ambos con metabolitos bioactivos fúngicos específicos (Figura 16).

Después de 30 días las placas se mantuvieron sin modificación respecto a lo visualizado en la finalización de la evaluación a los 15 días de cultivo. El antagonista inhibió el crecimiento del patógeno y no se evidenció crecimiento de ninguno sobre la colonia del otro a excepción de la zona del lateral rojo analizada microscópicamente.



**Figura 16.** Zona de la colonia de color rojo (63x), interacción entre *Acremonium strictum* (Conidios = flecha blanca continua; Hifas = flecha blanca discontinua) con *Alternaria alternata* (Conidios = flecha negra continua; Hifas = flecha negra discontinua).

Por otro lado, el antagonista *A.strictum* alcanzó un porcentaje de inhibición del crecimiento (PGI) del 22,99% contra *Bipolaris sp.*. Esto correspondió a un valor de categoría de inhibición del crecimiento (CIC) de 1, clasificándose como débil (Tabla 7), pero se manifestó una zona de inhibición de 8 mm en este tipo de enfrentamiento (Figura 17).

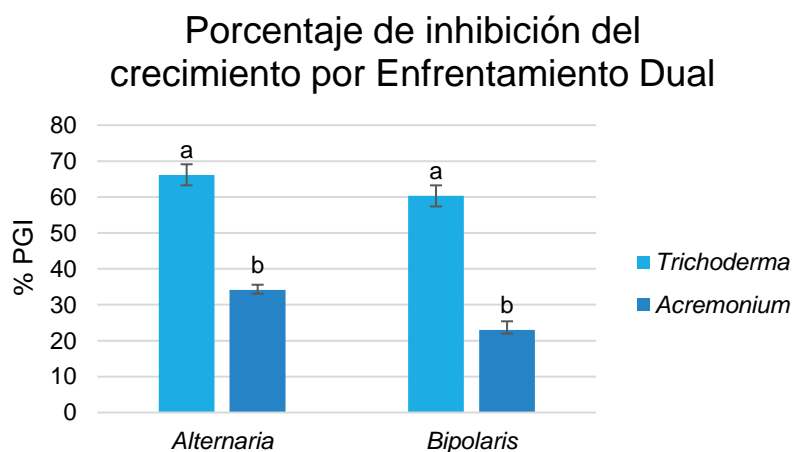


**Figura 17.** Enfrentamiento dual entre *A. strictum* (a la derecha de la placa, colonia blanca), y *Bipolaris sp.* (a la izquierda de la placa, colonia color oscuro), a los 14 días de crecimiento.

### Análisis estadístico:

Los datos de PGI se analizaron a través de ANOVA. Los residuales del modelo resultaron ser normales según la prueba de Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ) y las variancias homogéneas (prueba de Bartlett,  $p > 0.05$ ), confirmándose los supuestos del ANOVA.

El ANOVA de dos factores indicó que sólo hay efecto significativo del antagonista ( $p < 0.001$ ), *T. amazonicum* tiene un comportamiento diferente a *A. strictum* por enfrentamiento dual. A su vez, la prueba de comparaciones múltiples (LSD) detectó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los antagonistas independientemente del patógeno evaluado.



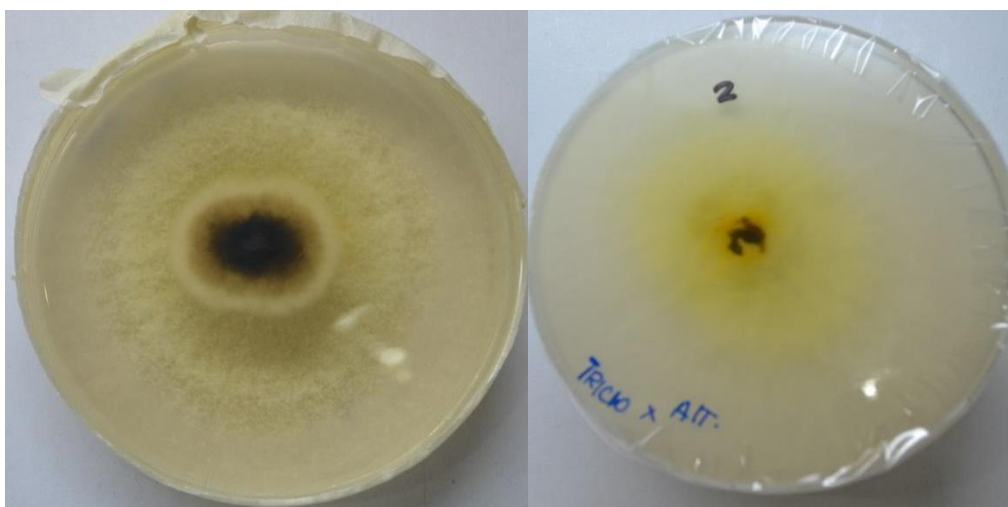
**Figura 18.** Porcentaje de inhibición del crecimiento por enfrentamiento dual entre patógenos (*Alternaria alternata* y *Bipolaris sp.*) y antagonistas (*Trichoderma amazonicum* y *Acremonium strictum*). Las barras verticales indican el error estándar de la media. Los valores medios con una letra común no son significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de 0,05.

## EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO POR PRODUCCIÓN DE METABOLITOS VOLÁTILES

**Tabla 8.** Porcentaje de Inhibición del crecimiento (PGI) y Categoría de inhibición del crecimiento (CIC) por metabolitos volátiles:

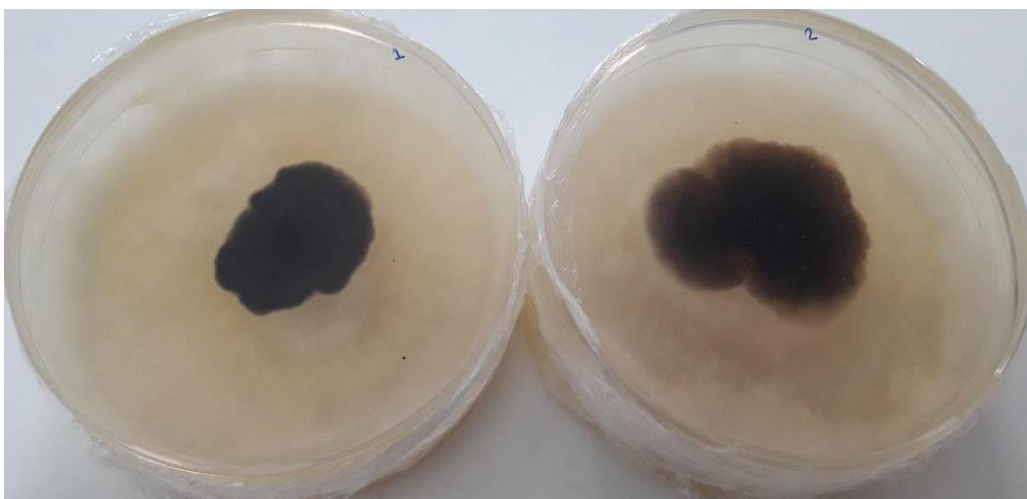
Metabolitos volátiles	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Bipolaris sp.</i>	
	PGI%	CIC	PGI%	CIC
<i>Trichoderma amazonicum</i>	28,99	2	19,05	1
<i>Acremonium strictum</i>	4,71	1	11,90	1

A) *T. amazonicum* logró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento por metabolitos volátiles contra el patógeno *A. alternata*, resultando en un 28,99 % a los 7 días de crecimiento. Por ende, fue clasificada en la categoría de inhibición del crecimiento moderada, (CIC) 2, (Tabla 8, Figura 19).



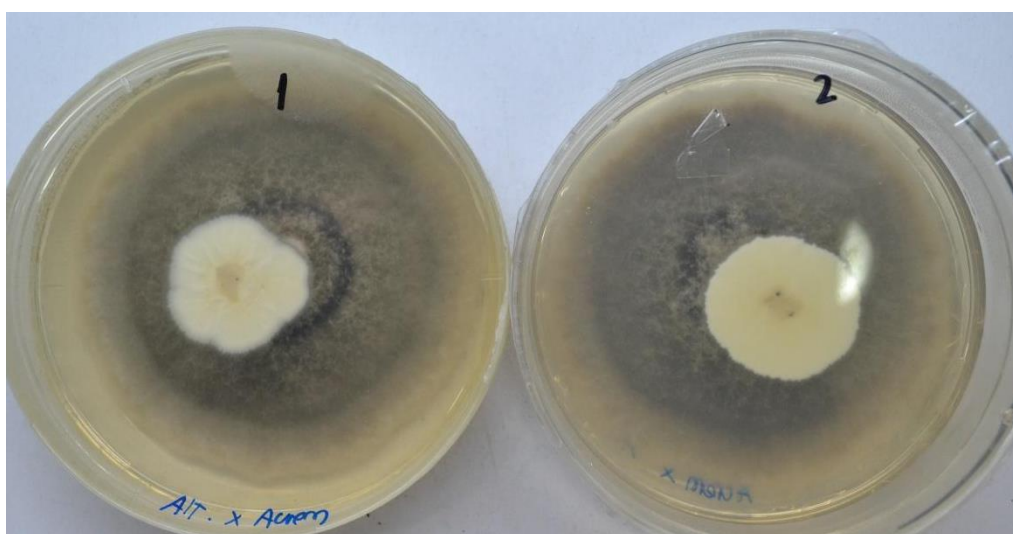
**Figura 19.** Enfrentamiento en placa superpuesta de *T. amazonicum* contra *A. alternata*, a los 7 días de cultivo. Imagen izquierda: en la placa inferior el anverso de la colonia del antagonista y en la superior el reverso del patógeno. Imagen derecha: reverso de la colonia del antagonista.

En el caso de *Bipolaris sp.* fue inhibido por *T. amazonicum* en un porcentaje menor a *A. alternata*, dando un valor de PGI% de 19,05% y categoría de inhibición débil (CIC 1) a los 7 días de cultivo (Tabla 8, Figura 20).



**Figura 20.** Enfrentamiento en placa superpuesta de *T. amazonicum* contra *Bipolaris sp.*, a los 7 días de cultivo por duplicado. En ambas placas inferiores se visualiza el anverso de la colonia del antagonista y en la superior el reverso del patógeno.

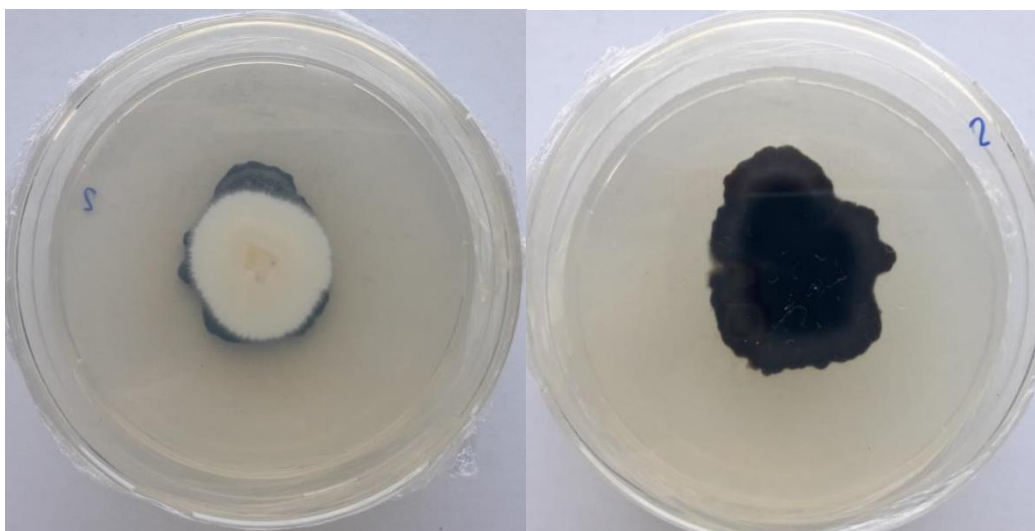
B) *A. strictum* alcanzó un porcentaje de inhibición del crecimiento contra *A. alternata*, de 4,71% a los 7 días de crecimiento. Por ende, fue clasificada en la categoría de inhibición del crecimiento débil (CIC) 1 (Tabla 8, Figura 21).



**Figura 21.** Enfrentamiento en placa superpuesta de *A. strictum* contra *A. alternata*, a los 7 días de cultivo por duplicado. En las placas inferiores se visualiza el anverso de la colonia del patógeno y en la superior el reverso del antagonista.

En el caso de *Bipolaris sp.* fue inhibido por *Acremonium sp.* en un porcentaje mayor a *A. alternata*, dando un valor de PGI% de 11,9% pero su capacidad de inhibición también fue categorizada como débil (CIC de 1) a los 7 días de cultivo (Tabla 8, Figura 22).



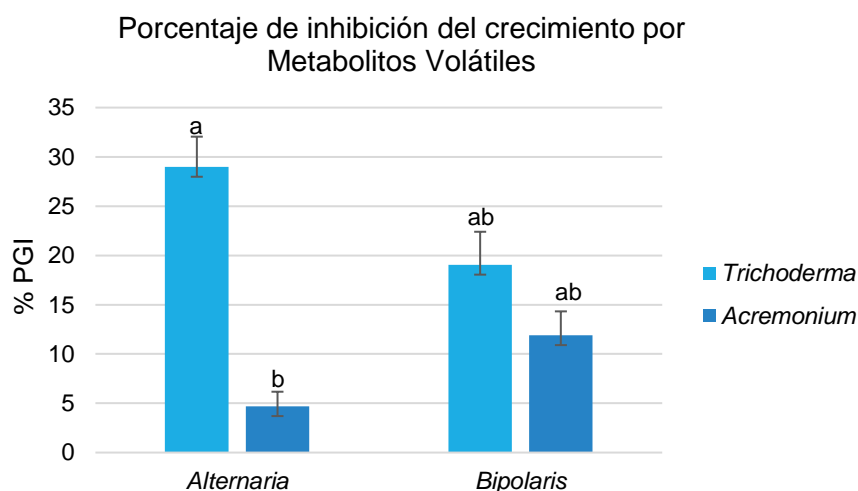


**Figura 22.** Enfrentamiento en placa superpuesta de *A. strictum* contra *Bipolaris* sp., a los 7 días de cultivo. Imagen izquierda: en la placa inferior el anverso de la colonia del patógeno y en la superior el reverso del antagonista. Imagen derecha: reverso de la colonia del patógeno.

#### Análisis estadístico:

Los datos de PGI se analizaron a través de ANOVA. Los residuales del modelo resultaron ser normales según la prueba de Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ) y las variancias homogéneas (prueba de Bartlett,  $p > 0.05$ ), confirmándose los supuestos del ANOVA.

El ANOVA de dos factores indicó que sólo hay efecto significativo del antagonista ( $p < 0,05$ ), por lo tanto *T. amazonicum* tiene un comportamiento diferente a *A. strictum*. A su vez, la prueba de comparaciones múltiples (LSD) detectó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los antagonistas solo para *A. alternata*.



**Figura 23.** Porcentaje de inhibición del crecimiento por metabolitos volátiles entre patógenos (*Alternaria alternata* y *Bipolaris sp.*) y antagonistas (*Trichoderma amazonicum* y *Acremonium strictum*). Las barras verticales indican el error estándar de la media. Los valores medios con una letra común no son significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de 0,05.

---

## PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE TÉCNICA DE EXCAVACIÓN-PLACA CULTIVO

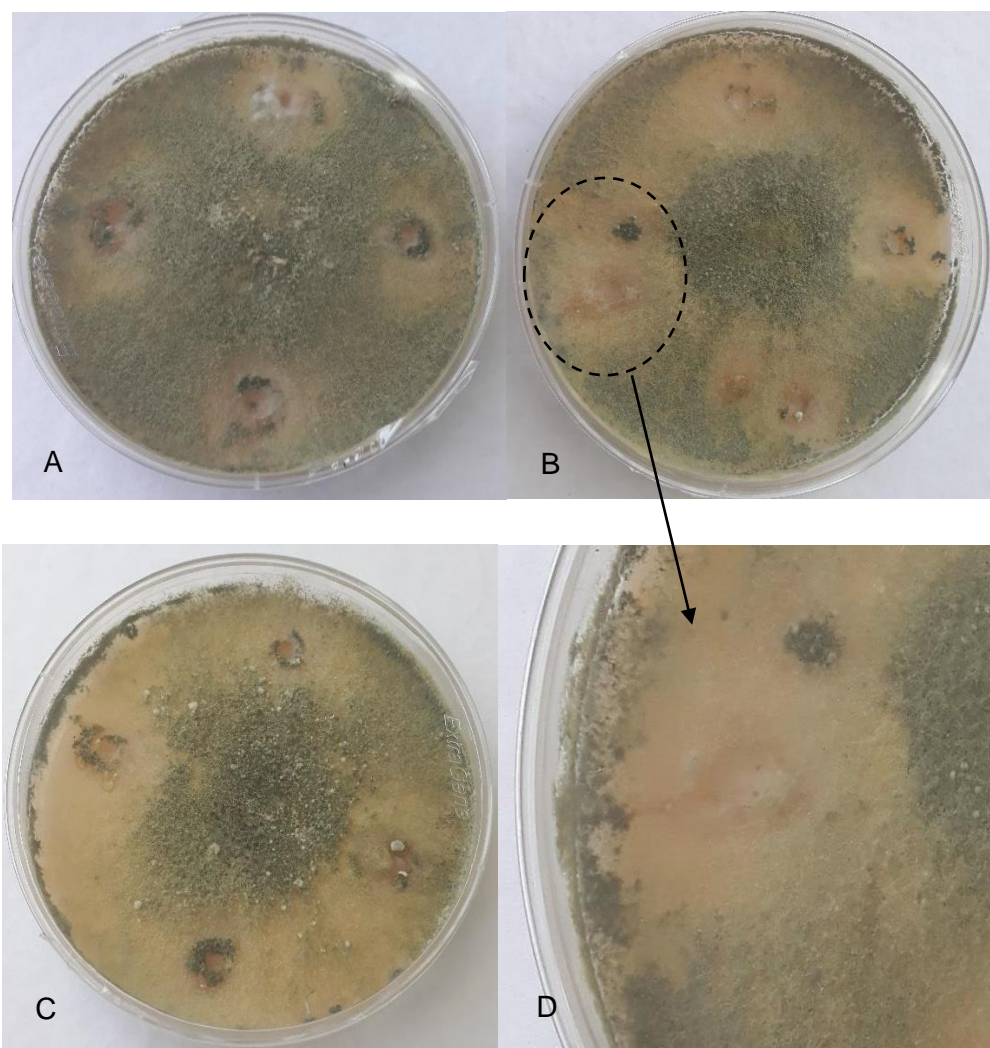
A) *Trichoderma amazonicum*: esta especie de crecimiento rápido y colonia inicialmente blanca y algodonosa cubrió rápidamente las placas de Petri en todas las repeticiones evaluadas (Figura 24).



**Figura 24.** Cultivo de *Trichoderma amazonicum* (4 días de crecimiento en medio PDA a 28°C) bajo excavación-placa cultivo con inóculo de *Claviceps paspali* en las 4 excavaciones.

Luego de los 4-5 días cuando las colonias normalmente se tornan al verde amarillento, consecuencia de la producción de conidios (Chaudhari *et al.*, 2011), se evidenció que en las cercanías de la excavación en placa con presencia de inóculo de *C. paspali*, hay una zona de inhibición más clara que en el resto (Figura 25, D). Esto fue encontrado en todas las réplicas analizadas y posiblemente se deba a una inhibición en los procesos relacionados a la esporulación del hongo antagonista (Figura 25).





**Figura 25.** Cultivo de *Trichoderma amazonicum* (10 días de crecimiento en medio PDA a 28°C y por triplicado A, B y C) bajo excavación-placa cultivo con inóculo de *Claviceps paspali*. Ampliación zona de inhibición foto D.

- *Acremonium strictum*: no se visualizó detención del crecimiento de esta cepa en la zona cercana a la excavación con inóculo de *C. paspali*, en ninguna de las repeticiones realizadas (Figura 26). Incluso se manifestó crecimiento sobre el patógeno, visualizándose como las hifas blanquecinas del endofito avanzaron sobre la región donde se encontraba el inóculo de ergot (Figura 27). En la zona que se halla entre las excavaciones, el antagonista creció libremente sin presencia de halos inhibitorios, detención ni modificaciones en el crecimiento normal de la cepa de *A. strictum*.



**Figura 26.** Cultivo de *Acremonium strictum* (10 días de crecimiento en medio PDA a 28°C y por triplicado) bajo excavación-placa cultivo con inóculo de *Claviceps paspali* en las excavaciones placa cultivo.



**Figura 27.** Ampliación de la zona de excavación con inóculo de *C. paspali* donde la cepa de *A. strictum* no manifestó inhibición de su crecimiento y como muestra la flecha, creció por encima de la perforación con el patógeno.

## DISCUSIÓN

Las gramíneas del género *Paspalum* constituyen la base forrajera de numerosas explotaciones ganaderas. Estas gramíneas, así como otras especies vegetales, establecen simbiosis con hongos que son importantes en la estructura, función y salud de las comunidades de plantas (Sánchez Márquez *et al.*, 2008).

Para poder aplicar soluciones sostenibles a problemas relacionados con la producción de alimentos, se ha evaluado el potencial biotecnológico de los microorganismos endofíticos en el área agronómica. El uso de estos en la producción agrícola tiene como objetivo el control de plagas, la mejora de la productividad, el desarrollo de las plantas y la recuperación de los sistemas ecológicos. Los endofitos juegan un rol importante en la evolución de la planta y en la resistencia al estrés a través de la producción de metabolitos bioactivos, cambios en el metabolismo enzimático y la expresión de genes relacionados con la resistencia (Yuan *et al.*, 2010), y esos efectos beneficiosos de varios géneros endofíticos pueden ser combinados (Tonial *et al.*, 2020).

Los microorganismos antagonistas proporcionan una fuente alternativa de control de patógenos. El control biológico es una alternativa al uso de pesticidas químicos con los beneficios de una mayor aceptación por parte del consumidor y un impacto ambiental reducido, importantes para mantener la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola (Es-Soufi *et al.*, 2020).

Dadas las características expresadas sobre la importancia de investigar la diversidad de hongos endofitos, las posibles simbiosis con especies gramíneas, establecer potenciales efectos en el control biológico de plagas y en el comportamiento del forraje, los resultados obtenidos en este capítulo demuestran una variada capacidad como controladores de patógenos de plantas *in vitro*:

✓ Para el caso de *T. amazonicum*, se obtuvieron valores de porcentaje de inhibición del crecimiento (PGI) superiores al 60% para los patógenos evaluados en enfrentamiento dual, correspondiéndoles una categoría de inhibición del crecimiento (CIC) de 3 y clasificándose como fuerte. Su crecimiento durante el enfrentamiento dual siempre fue más rápido que el de los patógenos *A. alternata* y *Bipolaris sp.* (Figuras 13 y 14, Tabla 7), demostrándose una ventaja significativa del antagonista en la competencia por el espacio y los nutrientes. Sin embargo, en todas las evaluaciones de esta tesis, la zona de inhibición se encontró ausente y el antagonista del género *Trichoderma*, creció sobre el patógeno. Esto último podría deberse principalmente a su mecanismo de micoparasitismo (Castro Toro y Rivillas Osorio, 2012).

Resultados similares han sido obtenidos recientemente en una especie de este género antagonista por Es-Soufi *et al.* (2020), donde un aislamiento de *T. harzianum* Rifai, se probó *in vitro* contra siete cepas de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, el agente causal de la antracnosis en frutilla. Se descubrió que las cepas de *T. harzianum* mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del patógeno mediante la técnica de cultivo dual en más del 80%.

En otro análisis sobre endofitos aislados de cultivares de trigo en la provincia de Buenos Aires, los aislamientos fúngicos fueron evaluados por su potencial como agentes de biocontrol contra *Pyrenophora tritici-repentis*, el agente causal de la mancha amarilla del trigo. Los endofitos también se seleccionaron usando técnicas de cultivo dual y examinando el efecto sobre el crecimiento en un ensayo de invernadero. En el experimento de invernadero, *T. hamatum* (Bon.) Bain, *Chaetomium globosum* Kunze y *Fusarium sp.* redujeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la severidad de la enfermedad en comparación con el control. Sin embargo, el mejor efecto antagonista se evidenció con *Trichoderma hamatum*, ya que resultó en la mayor supresión del crecimiento tanto en invernadero como en los cultivos duales (Larran *et al.*, 2015). Así mismo, *Trichoderma spp.* aislado también en trigo, mostró inhibiciones del crecimiento micelial y de la plasmólisis conidial e hifal de mancha amarilla (Perelló *et al.*, 2003; Perelló y Mónaco, 2007) y la reducción de la severidad de la enfermedad en condiciones de campo (Perelló y Dal Bello 2011).

Los resultados de esta investigación son consistentes con los obtenidos en numerosos estudios en *Trichoderma*, donde se ha probado su éxito desde hace varios años, como biocontrol de patógenos de plantas (Sutton y Peng 1993; Elad 1994; Michereff *et al.*, 1995; Perelló *et al.*, 2003; Perelló y Mónaco 2007; Larran *et al.*, 2015). Por otro lado, algunos aislamientos endofíticos han demostrado un efecto antagonista contra enfermedades de *Theobroma cacao* L. (cacao) (Bailey *et al.*, 2006) y contra el marchitamiento de lentejas por *Fusarium* (Dolatabadi *et al.*, 2012).

En este análisis, el mayor efecto antagonista se registró frente a *A. alternata* (66%), siendo consistente con reportes de análisis similares. Un estudio reciente de endofitos aislados en sorgo, mostró actividad antagonista significativa de una cepa de *T. asperellum* Samuels, contra patógenos del moho del grano de sorgo. Específicamente se analizaron bajo el método de cultivo dual los siguientes agentes causantes: *Fusarium thapsinum*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum sorghinum* y *Curvularia lunata*. Las reducciones en el crecimiento obtenidas (efecto antagónico) fueron 74%, 75%, 80% y 83%, respectivamente. Dado que estos patógenos dan como resultado un bajo rendimiento y una calidad reducida del grano de sorgo, los resultados revelan un enfoque ecológico y sustentable para explorar

aislamientos de *T. asperellum* en el manejo de la enfermedad (Rajini *et al.*, 2020). Por otro lado, el desarrollo de patógenos fue inhibido en menor porcentaje por compuestos volátiles que por enfrentamiento dual, para los patógenos evaluados (Tabla 7 y 8). Podría deberse a que la especie antagonista posee una tasa de crecimiento muy elevada, lo que contribuiría a mayor competencia por espacio y nutrientes, dando mejores resultados en enfrentamiento dual. Si bien los compuestos volátiles liberados por la respiración o la fermentación podrían ser perjudiciales para estos patógenos, parecen serlo en menor medida que la competencia por espacio y nutrientes.

En el enfrentamiento en placa superpuesta de *T. amazonicum* con *A. alternata* (Figura 19) el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno (PGI) fue de 28,99%, clasificado como categoría de inhibición moderada, (CIC) 2 (Tabla 8). Este valor fue el más alto encontrado en la evaluación por metabolitos volátiles. El enfrentamiento frente a *Bipolaris sp.* (Figura 20) dio como resultado un PGI menor al 20% (débil), demostrándose un efecto inferior de los metabolitos volátiles del antagonista sobre la tasa de crecimiento de esta cepa de *Bipolaris sp.* comparado con *A. alternata*. Del mismo modo, Dal Bello *et al.* (1997); evaluaron el accionar de los compuestos volátiles producidos por *Trichoderma hamatum* sobre diferentes géneros de patógenos fúngicos (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, entre otros). Los resultados obtenidos mostraron que todas las especies, salvo *B. sorokiniana* y *C. oryzae-sativae*, tuvieron alteraciones en su crecimiento y desarrollo. Esta es otra evidencia de que el género *Alternaria* parece ser más susceptible a las inhibiciones por metabolitos volátiles de *Trichoderma sp.* que el género *Bipolaris*.

Los menores efectos sobre la inhibición del crecimiento por metabolitos volátiles que por enfrentamiento dual obtenidos (Tabla 7 y 8), son consistentes con el estudio actual de Es-Soufi *et al.* (2020), donde se encontró que *T. harzianum* tuvo un alto efecto inhibitorio contra diferentes aislamientos de *C. acutatum*. Su crecimiento durante el enfrentamiento dual fue más rápido que el de los patógenos, alcanzando inhibiciones mayores al 80%. También fueron inhibidos por compuestos volátiles, pero en porcentajes inferiores al 46%. De aquí se manifiesta una ventaja significativa de *Trichoderma* en la competencia por el espacio y los nutrientes, incluso antes de desplegar su conjunto de micotoxinas, lo que explicaría los mejores resultados de los enfrentamientos duales.

En cuanto a los resultados obtenidos de la excavación en placa, *T. amazonicum* desarrolló su colonia rápidamente sobre el inóculo de ergot (Figura 24), pero no así su esporulación en las cercanías a los huecos con *C. paspali* (Figura 25). Esto parece demostrar que existirían metabolitos bioactivos capaces de inhibir la esporulación del antagonista por parte del patógeno *in vitro*.

Si bien existen pocos reportes del efecto antagónico sobre este patógeno, hay resultados variados para el género *Trichoderma* sobre *Claviceps sp.*, tal como se detalla en un estudio en mijo perla donde el agente causal de ergot (*Claviceps fusiformis* Loveless) fue controlado por especies del género analizado, *Trichoderma viride*, *T. virens* y *T. harzianum* (Singh *et al.*, 2003). En otro estudio realizado por Ondřej *et al.* (2010), se aislaron veinte especies fúngicas de esclerocios del cornezuelo (*C. purpurea* Tul) procedentes del cultivo de centeno. En las pruebas *in vitro* con la etapa anamórfica del cornezuelo de centeno (conocido como *Sphacelia segetum*), solo dos de ellos exhibieron una alta actividad micoparasitaria: *Clonostachys rosea* (Preus) Mussat y *T. harzianum*. A su vez, evaluaron la viabilidad de hibernar esclerocios de ergot en el suelo, la cual fue influenciada por su ubicación, edad, profundidad de colocación y tratamiento con una suspensión conidial del hongo *Clonostachys rosea*. Los valores de viabilidad más altos se informaron en esclerocios frescos de un año. En los esclerocios de dos años su viabilidad se redujo y su sensibilidad a la actividad microbiana fue mayor. Los esclerocios de 3 años o más no germinaron y todos fueron degradados microbiológicamente en el suelo. Más del 80% de la degradación de los esclerocios que tenían entre 1 y 2 años fue causada por el hongo *C. rosea*. La degradación de los esclerocios de 3 a 4 años fue provocada por bacterias, fauna del suelo (ácaros, nematodos) y hongos de los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Clonostachys*, etc. Los esclerocios frescos son más resistentes a la destrucción microbiana, los de más de dos años pierden su viabilidad y en el suelo sufren una degradación rápida en la que intervienen bacterias y un amplio espectro de hongos (*Fusarium*, *Ulocladium*, *Stachybotrys*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, etc.). Los estudios publicados en la literatura citan diferentes interacciones entre plantas, hongos endofitos y patógenos. Los más conocidos son los efectos de antagonismo de patógenos causantes de enfermedades por hongos endofitos, pero también existen interacciones neutrales y de facilitación (sinergismo). La modificación de la enfermedad de las plantas depende del contexto, el entorno abiótico y biótico (ambiente), la planta huésped y el patógeno (triángulo de la enfermedad). En otras palabras, la inoculación con el mismo endofito puede tener diferentes efectos sobre la gravedad de la enfermedad (Busby *et al.*, 2015).

Los alcaloides del tipo ergot han sido estudiados en el hongo del cornezuelo, *C. purpurea*, y se han reportado en algunos endofitos de plantas, como en el patógeno oportunista *Aspergillus fumigatus*. Estudios complejos adicionales en *A. fumigatus*, demostraron que la interrupción de un gen regulador (*brlA*), involucrado en la conidiación, interfirió con el desarrollo de conidióforos y con la producción de alcaloides del tipo ergot. La asociación de estas toxinas con la esporulación puede ofrecer una idea de su importancia ecológica y la utilidad para el hongo (Coyle, 2009). Posiblemente en nuestra investigación,

*T. amazonicum* por su gran capacidad de competir por nutrientes y espacio, logró colonizar rápidamente toda la placa de las repeticiones analizadas, inclusive en las zonas cercanas al inóculo de ergot, pero la presencia de algún alcaloide del tipo ergot, parece estar relacionado a la disminución en la conidiación del antagonista en zonas cercanas al inóculo de *C. paspali*.

✓ *Acremonium strictum* en cultivos duales, enfrentado a los patógenos evaluados, obtuvo valores de porcentajes de inhibición del crecimiento (PGI) de entre el 22% y 34% (Tabla 7).

En el enfrentamiento de *A. strictum* y *A. alternata* la inhibición del crecimiento del patógeno (PGI) dio un valor de 34,12% (Tabla 7), clasificándose como moderada y siendo mayor que en *Bipolaris sp.*. No existió halo inhibitorio y se observó que, en la zona cercana a las colonias de ambos hongos (enfrentamiento), el micelio del antagonista posee una coloración rojiza y en imágenes microscópicas de esta región se evidenciaron las estructuras reproductivas de ambos hongos (Figura 15 y 16). En este caso, el mecanismo causante de la inhibición moderada, podría ser la producción y liberación de metabolitos secundarios por parte de la cepa antagonista en el medio (tonalidad roja), que impiden el desarrollo del hongo patógeno. Otra posibilidad es que exista competencia por nutrientes. Un efecto antagónico positivo indica posible competencia por nutrientes entre ambas especies (Wilson *et al.*, 1991), ya que se ha observado que las cepas patógenas detienen su crecimiento en medios de cultivo escasos de nutrientes (Heuvel, 1971; Mishra y Tewari, 1976).

Frente a *Bipolaris sp.* el valor de PGI fue el más bajo, 22,99% (Tabla 7), incluyéndose en la categoría débil. Sumado a esto, registramos que la zona de inhibición también fue clasificada como débil (8 mm), por lo tanto, se evidencia que, si bien existe una capacidad de inhibición *in vitro*, es débil para este patógeno (Figura 17).

Los menores valores para este antagonista, se obtuvieron en las pruebas de metabolitos volátiles (Tabla 8). Estos resultados de PGI en los enfrentamientos de *A. strictum* con *A. alternata* y *Bipolaris sp.* fueron menores al 12%, siendo el primero de 4,71% y 11,9% el segundo. En base a estos valores, no se evidencian efectos contundentes por metabolitos volátiles del antagonista sobre el crecimiento normal de estos patógenos (Figura 21 y 22). Sin embargo, si se manifiesta un mayor potencial biocontrolador de *A. strictum* como inhibidor por enfrentamiento dual (Tabla 7 y 8).

El rol significativo de los endofitos del género *Acremonium* y sus metabolitos en el manejo de enfermedades de plantas han sido descritos en la literatura. García Lemos *et al.* (2017) reportaron que los endofitos del género *Acremonium* mostraron una actividad



antagonista muy variable contra las especies patógenas de *Alternaria* probadas en cultivos duales. El aislado 033 tuvo la mayor actividad antagonista contra *A. alternata* y *Alternaria sp.*, con un PGI de 91.42% y 91.35%, respectivamente, y ambos con un CIC de 4, clasificándose como muy fuerte. Los aislamientos 040 y 052 también tuvieron un CIC de 4, con un PGI 77.14% y 76.18%, respectivamente para *A. alternata*, mientras que los aislamientos 050 y 064 mostraron el porcentaje más bajo de inhibición con un valor de PGI de 44.76% y 39.04% respectivamente y un CIC de 2 (moderado). El efecto antagonista del aislado 064 contra *Alternaria sp.* tuvo el valor más bajo de PGI resultando en 4,93% y un CIC de 1 (débil).

El endofito *Acremonium sp.* según diferentes reportes bibliográficos, tuvo actividad antifúngica contra el patógeno de pudrición blanda *Pythium myriotylum* Drechsler, al producir gliotoxinas, un metabolito de control biológico (Anisha y Radhakrishnan, 2015). Del mismo modo, *Acremonium sclerotigenum* Gams, aislado de las hojas de *Terminalia bellerica* Roxb., exhibió la mayor actividad inhibitoria contra patógenos de plantas del género *Fusarium* y *Colletotrichum* (Prathyusha *et al.*, 2015). Otro estudio indica que *Acremonium sp.* aislado de distintas variedades de arroz de Sri Lanka, inhibió al hongo de la piriculariosis *Magnaporthe grisea* Barr. (Atugala y Deshappriya, 2015). Según otros informes, la suspensión de esporas de *Acremonium sp.* redujo el marchitamiento por *Fusarium* en un 87% en las plántulas de palmera datilera (El-Deeb y Arab, 2013). En el estudio de Chowdhary y Kaushik (2018) la acción antifúngica más alta contra la pudrición del tallo causada por *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary, se expresó mediante el uso de un extracto concentrado de *Acremonium sp.*. Los estudios de Wicklow *et al.*, (2005) evidenciaron que la actividad antimicrobiana de *Acremonium zeae* Gams en gramíneas es debido a la producción de pyrrocidinas, componentes que parecen aumentar las defensas de la planta frente a patógenos fúngicos y bacterianos (Wicklow *et al.*, 2005; Sánchez-Márquez *et al.*, 2012).

En este estudio en particular de excavación placa cultivo, no se visualizó detención del crecimiento de *A. strictum* en la zona cercana al hueco con inóculo de *C. paspali* (Figura 26). Incluso, en la zona que se halla entre las excavaciones, el antagonista creció libremente sin presencia de halos inhibitorios, detención ni modificaciones en el crecimiento normal de la misma (Figura 27). Dado que no se pudo evaluar antagonismo sobre la colonia del patógeno por ser no cultivable *in vitro* pero no existió detención del crecimiento del antagonista frente al inóculo del patógeno, se podría inferir que existiría algún posible efecto antagónico de la especie *A. strictum* frente al inóculo de *C. paspali*. El mecanismo de antagonismo más probable, podría ser en este caso micoparasitismo, debido a la capacidad que presenta *A. strictum* de crecer sobre otros hongos (Gams *et al.*, 2004), como fue visualizado en la figura 27. Estos resultados parecen ser consistentes con reportes que

indican que *Acremonium sp.* es uno de los géneros que degradan esclerocios de ergot (Ondřej *et al.*, 2010).

Si bien los resultados *in vitro* no necesariamente indican lo que ocurre *in planta*, son muy útiles para la identificación de antagonistas candidatos a ser utilizados para el control biológico y permiten hacer conjeturas sobre los mecanismos por los cuales estas cepas reducen los daños causados por patógenos.

En base a los resultados descritos en este capítulo, se logró alcanzar el objetivo específico planteado inicialmente obteniendo resultados que permiten aceptar la hipótesis 2: “Los hongos endofitos actúan como agentes de control biológico contra diversos patógenos fúngicos generadores de enfermedades en especies forrajeras del género *Paspalum*” (*in vitro*).

## CONCLUSIONES

- El objetivo planteado fue alcanzado exitosamente, pudiéndose evaluar la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades de *Paspalum*, probando su efecto antagónico contra fitopatógenos mediante pruebas *in vitro*.
- La hipótesis 2: “Los hongos endofitos, actúan como agentes de control biológico contra diversos patógenos fúngicos causantes de enfermedades en especies forrajeras del género *Paspalum*” fue aceptada.
- La especie *Trichoderma amazonicum* hallada en *Paspalum notatum*, presentó alto potencial para el control biológico *in vitro* de los patógenos fúngicos de gramíneas, *Alternaria alternata* y *Bipolaris sp.*
- *T. amazonicum*, lograría inhibir en algún punto a *C. paspali* por su gran capacidad competitiva, pero la presencia de algún alcaloide del tipo ergot disminuiría la esporulación del antagonista.
- Los posibles mecanismos de biocontrol ejercidos por *Trichoderma amazonicum* son micoparasitismo y competencia por recursos.
- La especie *Acremonium strictum* hallada en *Paspalum dilatatum*, demuestra moderado a bajo potencial *in vitro* como controlador de *Alternaria alternata* y *Bipolaris sp* respectivamente.
- Existiría un efecto antagónico por micoparasitismo de la especie *Acremonium strictum* frente al inóculo de *C. paspali*.
- Los mecanismos más importantes de biocontrol ejercidos por *Acremonium strictum*, parecerían ser la producción y liberación de metabolitos secundarios y la competencia por recursos.
- El potencial biocontrolador de los antagonistas evaluados por metabolitos volátiles es relativamente bajo.

## BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Suárez, M. (2013). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. ISSN 1609-1841, RNPS: 0397
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Hanna WW, and Kenworthy KE (2007). Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. *Crop Science*, 47: 1711 - 1717
- Anisha C, Radhakrishnan EK. 2015. Gliotoxin-producing endophytic Acremonium sp. from *Zingiber officinale* found antagonistic to soft rot pathogen *Pythium myriotylum*. *Appl Biochem Biotechnol*. 175(7):3458–3467. doi:10.1007/s12010-015-1517-2.
- Anjos, J. R. N., Charchar, M. J. A., Teixeira, R. N., & Anjos, S. S. N. (2004). Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29(6), 656–658. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582004000600010>
- Atugala DM, Deshappriya N. 2015. Effect of endophytic fungi on plant growth and blast disease incidence of two traditional rice varieties. *J National Sci Found Sri Lanka*. 43(2):173–187.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuels, G.J., Choi, I-Y., Holmes, K.A., 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224, 1449-1464
- Blount, A. R., and Acuña, C. A. 2009. Bahiagrass. Pages 81-110 in: Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series: Forage crops, vol. 5. R. J. Singh, ed. CRC, Boca Raton, FL.
- Burton, GW (1955). Breeding Pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. method of reproduction. *Agronomy Journal*, 47: 311 – 314
- Burton, G. W. y Lefebvre, C. L. 1948. Ergot and sterility in bahiagrass. *Phytopathology* 38:556-559.
- Busby, P. E., Ridout, M., & Newcombe, G. (2015). Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 645–655. doi:10.1007/s11103-015-0412-0
- Castro Toro, A. M. y Rivillas Osorio (2012). *Trichoderma spp.* Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Genicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Chaudhari, P.J., Shrivastava, P., Khadse, A.C., 2011. Substrate evaluation for mass

cultivation of *Trichoderma viride*. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources* 2, 441-446.

- Chowdhary K & Kaushik N (2018): Biodiversity study and potential of fungal endophytes of peppermint and effect of their extract on chickpea rot pathogens, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2018.1440707
- Clayton WD, Harman KT, Williamson H (2006). *Grass Base - The Online World Grass Flora*. URL: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. (Consultado junio 2011)
- Coyle CM. (2009). "Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* : Association with sporulation and clustered genes common among ergot fungi". Graduate Theses, Dissertations, and Problem Reports. 4453.
- Dal Bello GM, Mónaco CI y Cháves AR (1997). Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana de Micología* 12:131-134
- DENNIS, C., WEBSTER, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57:26-39
- Dolatabadi, H.K., Mohammadi Goltapeh, E., Mohammadi, N., Rabiey, M., Rohani, N., Varma, A., 2012. Biocontrol potential of root endophytic fungi and *Trichoderma* species against *Fusarium* wilt of lentil under In vitro and greenhouse conditions. *J. Agr. Sci. Tech.* 14, 407- 420.
- Elad, Y., 1994. Biological Control of Grape Grey Mold by *Trichoderma harzianum*. *Crop Prot.* 13, 35.
- El-Deeb HM, Arab YA. 2013. *Acremonium* as an endophytic bioagent against date palm *Fusarium* wilt. *Archives Phytopathol Plant Protect.* 46(10):1214–1221. doi:10.1080/0323 5408.2013.763615.
- Es-Soufi, RCas., Tahiri, H., Azaroual, L., El Oualkadi, A., Martin, P., Badoc, A. and Lamarti, A. (2020) In Vitro Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. *Advances in Microbiology*, 10, 82-94. <https://doi.org/10.4236/aim.2020.103008>
- Gamboa M (2006). Hongos Endofitos Tropicales: Conocimiento Actual Y Perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11: 3 - 20
- Gams W, Diederich P, Poldmaa K (2004). Fungicolous fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds.), *Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods*. Elsevier. USA. 343–392.

- García M, Arturi MJ, Ansín OE (2001). Potencial de mejora en caracteres cuantitativos de *Paspalum dilatatum* Poir en poblaciones del noreste bonaerense. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata- Argentina, 2: 104 - 105
- García Lemos A (2015). Hongos endofitos presentes en especies forrajeras de la Región Pampeana, evaluación de su potencial como agentes antagónicos y productores de metabolitos bioactivos. Tesis de Maestría en Recursos Naturales, UNR.
- García Lemos A, Gil-Cardeza ML, Gómez EdV and Felitti SA. (2017). Fungal Endophytes in Species of *Paspalum* and *Bromus*, Occurrence and In Vitro Antagonistic Activity Assessment. Research & Reviews: Research Journal of Biology, 5:11-25
- García-León E, S. Gerardo Leyva-Mir<sup>2</sup>, H. Eduardo Villaseñor-Mir<sup>3</sup>, M. Florencia Rodríguez-García<sup>3</sup>, J. Manuel Tovar-Pedraza<sup>1</sup>. (2013). IDENTIFICATION AND INCIDENCE OF THREE PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF NEW REPORT ON OAT (*Avena sativa* L.) AT MEXICO'S CENTRAL PLATEAU. *Agrociencia* 47: 815-827. 2013.
- Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z., Che, Y.S., 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research* 111, 87-92.
- Ghazanfar MU, Raza M, Raza W, Qamar MI (2018). TRICHODERMA AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENT, ITS EXPLOITATION IN AGRICULTURE: A REVIEW. *Plant Protection*, 02 (03) 109-135
- Feldman TS, O'Brien HE, Arnold AE (2008). Moths that Vector a Plant Pathogen Also Transport Endophytic Fungi and Mycoparasitic Antagonists. *Microbial Ecology*, 56: 742 – 750
- Fokkema NJ (1978). Fungal antagonism in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89: 115 - 117
- Heuvel J Van Den (1971). Antagonism between pathogenic and saprophytic *Alternaria* species on bean leaves. In: Preece TF and Dickinson CH (Eds.), *Ecology of Leaf Surface Microorganisms*, Academic Press. England. 537-544.
- JALGAONWALA, L R. E. (2011). A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1, (2): 21-32.
- Larran, S., Simón, M.R., Moreno, M.V., Santamarina Siurana, M.P., Perelló, A. (2015). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease, *Biological Control*, doi: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002)
- Leon VC, M Raja, R Thava Prakasa Pandian, A Kumar y Pratibha Sharma (2018). Opportunistic endophytism of *Trichoderma* species in rice Pusa Basmati-1 (PB1).

Indian Journal of Experimental Biology Vol. 56, February 2018, pp. 121-128

- Mata-Santoyo CI, Leyva-Mir SG, Camacho-Tapia M, Tovar-Pedraza JM, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, García-León E. (2018). Aggressiveness of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* isolates on wheat cultivars in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 432-443. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-3
- Mey G, Oeser B, Lebrun MH and Tudzynski P (2002). The Biotrophic, Non-Appressorium-Forming Grass Pathogen *Claviceps purpurea* Needs a Fus3/Pmk1 Homologous Mitogen-Activated Protein Kinase for Colonization of Rye Ovarian Tissue. *The American Phytopathological Society*, Vol. 15, No. 4, 2002, pp. 303–312.
- Michereff, S.J., Da-Silveira, N.S.S., Reis, A., Mariano, R.L.R., 1995. Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. *Micopathologia* 130, 103-108.
- Mishra RR y Tewari RP (1976). Studies on biological control of *Puccinia graminis tritici*. In: Dickinson CH and Preece TF (Eds.), *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Academic Press. England. 559-567.
- Okeke B, Murandi FS, Steiman R, Buarque N (1994). Fungal metabolite extracts active against phytopathogens. *The Science of the Total Environment*, 155: 125130.
- Ondřej M., Cagaš B., Ondráčková E. (2010): Effect of the mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia on their viability. *Plant Protect. Sci.*, 46: 66-71.
- Perelló, A., Mónaco, C., Simón, M.R., Sisterna, M., Dal Bello, G., 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Prot.* 22, 1099-1106.
- Perelló, A., Mónaco, C., 2007. Status and Progress of biological control of foliar diseases of wheat in Argentina. In: Pawan Kumar (ed) *Ecofriendly Management of Seedborne Diseases*. Scientific Publishers, Jodhpur, India, 283-321.
- Perelló, A., Dal Bello, G., 2011. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biologic inducers in field conditions. *Annals of Applied Biology* 158, 267-274.
- Prathyusha P, Rajitha Sri AB, Ashokvardhan T, Satya PK. 2015. Antimicrobial and siderophore activity of the endophytic fungus *Acremonium sclerotigenum* inhabiting *Terminalia bellerica* Roxb. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 30(1):84–87.
- Rajini, S. B., Nandhini, M., Udayashankar, A. C., Niranjana, S. R., Lund, O. S., & S.Prakash, H. (2020). Diversity, plant growth promoting traits and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.13151
- Rios, E., Blount, A., Harmon, P., Mackowiak, C., Kenworthy, K., and Quesenberry, K. 2015. Ergot resistant tetraploid bahiagrass and fungicide effects on seed yield and quality. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-RS-14-0051.



- Sánchez Márquez S, Bills GF, Zabalgoceazcoa I (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, 33: 87 - 100
- Sánchez Márquez S, Bills G, Herrero N, Zabalgoceazcoa I (2012). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5: 289 -297.
- Seyis, I., Aksoz, N., 2005. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55, 115-119.
- Skidmore AM and Dickinson CH (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septena nodurum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 57 - 64
- Singh US, Mishra DS, Varshney S, Zaidi NW, Khan T, Joshi D, Sharma R, Singh S, Singh N. (2003). Potential and effectiveness of fungi and bacteria as biocontrol agents for plant disease management. In: *Integrated Pest Management: Principles and application*. In press
- Sutton, J., Peng, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathol.* 83, 615-621.
- Tagne AM, Neergaard E, Hansen HJ (2002). Studies of host-pathogen interaction between maize and *Acremonium strictum* from Cameroon. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 93–102.
- Tonial F, Falcão de Macedo Nava F, Gayger AL and Bernardon Mar T (2020). Endophytes Potential Use in Crop Production [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.91721.
- Yuan Z, Zhang C, Lin F (2010). Role of diverse non systemic fungal endophytes in plant performance and response to stress: Progress and approaches. *Journal of Plant Growth Regulation*. 29:116-126.
- Wicklow D, Roth S, Deyrup S, Gloer J (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109: 610–618. doi:10.1017/S0953756205002820
- Wilson LC, Wisniewski EM, Biles LC, McLaughlin R, Chalutz E, Droby S (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection*, 10: 172-177.
- Živković S. (2010). Screening of Antagonistic Activity of Microorganisms Against *Colletotrichum Acutatum* And *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Archives of Biological Science Belgrade*, 62: 611-623.

## **CAPITULO IV: EFECTO DE LOS ENDOFITOS SOBRE LOS COMPONENTES AGRONOMICOS Y ANÁLISIS *IN PLANTA* DE LA INTERACCIÓN ENDOFITO-PATÓGENO**

### **OBJETIVO ESPECÍFICO 3**

**Puesta a punto de un protocolo a fin de obtener plantas isogénicas de *Paspalum* E- (libres de endofito) y E+ (infectadas) para estudios comparativos posteriores.**

### **OBJETIVO ESPECÍFICO 4**

**Medición de parámetros agronómicos en plantas infectadas y no infectadas con el hongo endofito, tales como: altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea; cobertura, características nutritivas y evaluación de control de enfermedades *in planta* como consecuencia de la presencia del hongo endofito.**

**Depetris, M. B., Acuña, C. A., Gutierrez, S., Marcón, F., & Felitti, S. A. (2020).** Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. **Grass and Forage Science**, 75:316–325. [doi.org/10.1111/gfs.12494](https://doi.org/10.1111/gfs.12494)

**Depetris, MB; Acuña CA; Gutiérrez S, Felitti, SA. (2018).** Diversidad de Hongos Endofitos en *Paspalum* y su Efecto Sobre el Comportamiento Agronómico de la Planta. Santiago de Chile, Chile. Revista. Resumen. Congreso. **XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018.** Asociación Latinoamericana de Microbiología.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las prácticas agrícolas dependen del uso de agroquímicos en grandes cantidades y su utilización trae aparejados perjuicios para el medio ambiente. La expansión de estas prácticas con el fin de satisfacer las necesidades de generaciones futuras, no son sostenibles económica ni ecológicamente en el tiempo (Patle *et al.*, 2018).

Los microorganismos endofitos, viven dentro del microambiente de la planta huésped, reciben protección contra el estrés ambiental y tienen mayor acceso a los nutrientes con menor competencia de otros microbios (Patle *et al.*, 2018). Están influenciados por varios componentes, como las especies hospedadoras, la etapa de desarrollo del hospedador, la ubicación geográfica y las condiciones ambientales. El análisis de la diversidad de hongos endofíticos en diferentes tipos de suelos y regiones es importante, ya que ayuda a dilucidar y comprender su función ecológica y su frecuencia dentro de una planta hospedante en particular (Yokoya *et al.*, 2017). Son habitantes muy extendidos dentro de los tejidos vegetales y se ha demostrado que ejercen efectos beneficiosos, mejoran el crecimiento y el rendimiento, ya sea directa o indirectamente, a través de varios mecanismos. A causa de la interacción con hongos endofitos ocurren cambios fisiológicos dentro de las plantas y entre los beneficios reportados encontramos: incremento en la tasa fotosintética, mejora en la absorción de fosfatos, mayor tolerancia a estrés salino, aumento en el crecimiento y resistencia a organismos patógenos (Clay, 1998; Bacon y White, 2000; Compant *et al.*, 2005; Gamboa *et al.*, 2006; Gundel *et al.*, 2013; Patle *et al.*, 2018). A su vez, logran la mejora de la productividad de los cultivos y el mantenimiento de la salud del suelo, siendo un objetivo para lograr la sostenibilidad de la agricultura a largo plazo (Patle *et al.*, 2018).

En este estudio, se focalizó en el análisis de los efectos de los endofitos (aislados en el capítulo II) en el crecimiento (midiendo parámetros agronómicos) y sobre patógenos fúngicos causantes de enfermedades (*in vitro* e *in vivo*).

---

### EFECTO DE LOS ENDOFITOS EN EL CRECIMIENTO VEGETAL

La mayoría de las plantas albergan endofitos en el interior de sus tejidos generando un estrecho vínculo que promueve el crecimiento de diferentes maneras (Patle *et al.*, 2018). Producen compuestos o metabolitos bioactivos con varias actividades biológicas que pueden describirse directa o indirectamente como fitohormonas o agentes promotores del crecimiento vegetal (PGP) (Waqas *et al.*, 2012). A su vez, poseen una capacidad vital para movilizar fósforo insoluble y facilitar nitrógeno a sus plantas hospedantes, producen sideróforos y promueven el intercambio de nutrientes que conducen positivamente al

crecimiento (Hallmann *et al.*, 1997; Waqas *et al.*, 2012; Matsuoka *et al.*, 2013; Patle *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que tienen el potencial de eliminar contaminantes del suelo al mejorar la fitorremediación. Existe un interés creciente en desarrollar las posibles aplicaciones biotecnológicas de los endofitos para mejorar la fitorremediación y la producción sostenible de cultivos no alimentarios para la producción de biocombustibles (Lodewyckx, 2001).

Sin embargo, la información disponible sobre el crecimiento y sus actividades biológicas no es equivalente a la alta distribución de endofitos. Una comprensión superior puede ayudar a aclarar sus capacidades y su potencial para mejorar el crecimiento en la producción de cultivos estableciendo un sistema sostenible. Dado que los endofitos promotores del crecimiento pueden tener un papel importante en el aumento de la disponibilidad de nutrientes e indirectamente en el rendimiento del cultivo de una manera sustentable, decidimos estudiar los posibles efectos en el género *Paspalum*.

---

## EFEECTO DE LOS ENDOFITOS SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS

En los sistemas productivos agrícolas se utilizan fungicidas químicos sintéticos para el manejo de enfermedades fúngicas, lo que conduce a un mayor impacto ambiental negativo, incluido el desarrollo de cepas patógenas resistentes a los pesticidas. Además, su uso reiterado causa serios problemas en la salud de humanos y animales debido a su carcinogenicidad, teratogenicidad y toxicidad aguda (Tian *et al.*, 2011). Debido a estos problemas, la agricultura moderna se enfrenta al desafío de identificar y desarrollar alternativas ecológicas a los pesticidas químicos.

Los endofitos con efecto de biocontrol han recibido atención como una alternativa al control químico de enfermedades, lo cual reduciría el uso de químicos potencialmente peligrosos (Bacon *et al.*, 2001; Porras-Alfaro y Bayman, 2011). El potencial de estos hongos en el control biológico ha sido documentado en la literatura. Los endofitos aislados de las raíces del algodón exhibieron actividad antifúngica contra *Verticillium dahliae*, la causa de la marchitez por *Verticillium* en el algodón (Yuan *et al.*, 2017). Lahlali y Hijri (2010) informaron que los endofitos *Trichoderma atroviride* y *Epicoccum nigrum* aislados de *Acer platanoides* inhibieron a *Rhizoctonia solani* y disminuyeron significativamente el índice de gravedad de la enfermedad del tallo en la papa, con un aumento en el rendimiento (Waqas *et al.*, 2012).

En sorgo (*Sorghum bicolor*), se evaluó el potencial control biológico de endofitos aislados contra patógenos del moho del grano, económicamente destructivos como *Fusarium thapsinum*, *Epicoccum sorghinum*, *Alternaria alternata* y *Curvularia lunata*,

utilizando el método de cultivo dual. El potencial de biocontrol fue exhibido por 26 aislamientos endofíticos, de los cuales *Trichoderma asperellum* registró una actividad de amplio espectro contra patógenos, seguida por *Epicoccum nigrum* y *Alternaria longipes*. A su vez, la mayoría (82%) de los endofitos mostraron rasgos que promueven el crecimiento de las plantas (Rajini *et al.*, 2020).

*Trichoderma spp.* y otros hongos endofíticos aislados de hojas y vainas de *Theobroma cacao*, han mostrado un efecto antagónico contra los tres patógenos más comunes y económicamente importantes del cacao, *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora roerei* y *Moniliophthora perniciosa* (Bailey *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2008).

En trigo, los estudios sobre hongos endofíticos del género *Chaetomium sp.*, aislado de hojas sanas, redujeron el número y el desarrollo de pústulas de roya *Puccinia recondita sp. tritici* (Dingle y McGee, 2003). Además, diferentes especies de *Chaetomium* inhibieron el crecimiento de *Pyrenophora tritici-repentis in vitro* (Istifadah *et al.*, 2006). En un experimento de invernadero *Trichoderma hamatum*, *Chaetomium globosum* y *Fusarium sp.* significativamente redujeron la severidad promedio de la enfermedad en comparación con el control. Sin embargo, el mejor efecto antagonista se demostró con *T. hamatum*, ya que resultó en la mayor supresión en el invernadero y en los ensayos de enfrentamiento dual (Larran *et al.*, 2016).

Varios endofitos producen compuestos que inhiben el crecimiento de otros hongos *in vitro*; por ejemplo, Yue *et al.* (2000) identificaron varios derivados del indol, un sesquiterpeno y una diacetamida de *Epichloë festucae*. Sin embargo, ha sido difícil vincular la inhibición de patógenos *in vitro* con la resistencia a enfermedades exhibida *in vivo*. En el caso de *E. festucae*, los individuos infectados han mostrado una resistencia significativa sobre los no infectados a dos patógenos principales de la mancha foliar (enfermedad de la mancha del dólar) causada por *Sclerotinia homeocarpa* (Clarke *et al.*, 2006); enfermedad del hilo rojo causada por *Laetisaria fusiformis* (Bonos *et al.*, 2005). Se desconoce si el mecanismo de mayor resistencia a las enfermedades es atribuible a compuestos antifúngicos producidos por el endofito, compuestos producidos por la planta en respuesta al endofito, competencia trófica entre hongos o algún mecanismo de exclusión física (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los hongos endofíticos más comunes en las plantas terrestres son de origen no clavicipitáceo e incluyen un conjunto diverso de hongos en su mayoría ascomicetos, que no han sido muy estudiados especialmente en términos de su importancia ecológica y funcional en plantas. Los efectos de los hongos endofitos no clavicipitáceos en la planta hospedante varían desde antagonistas (por ejemplo, patógenos) hasta mutualistas (Arnold, 2007).

El cornezuelo, Ergot, causada por *Claviceps paspali* (biótrofo), ha sido informada como una de las enfermedades más importantes en *Paspalum*. Reduce la calidad de las semillas de determinadas variedades (Burton, 1955; Acuña *et al.*, 2007), lo que limita el suministro de semillas, conlleva al aumento del costo de plantación y afecta el establecimiento de las plantas. A partir de los prometedores resultados reportados en hongos endofitos, se decidió analizar el potencial control biológico de patógenos causantes de enfermedades con el objetivo de hallar soluciones amigables con el medio ambiente en los sistemas productivos.

La evaluación de endofitos en el manejo de enfermedades en cultivos es una potencial estrategia al control de enfermedades. Aunque se ha informado de la actividad antimicrobiana y las propiedades promotoras del crecimiento en plantas por un gran número de endofitos, solo se han comercializado algunos de ellos (Rajini *et al.*, 2020).

En el estudio actual, hemos centrado nuestra investigación en comprender las características que promueven el crecimiento de las plantas y su potencial control biológico contra *C. paspali*. Basados en los resultados de la diversidad de endofitos en cada especie (resultados capítulo II), se evaluó el potencial biocontrolador *in vitro* de dos especies de endofitos sobre patógenos fúngicos (resultados capítulo III). Para evaluar a su vez, el efecto de los mismos en el crecimiento vegetal (producción de forraje) y el potencial biocontrolador *in vivo*, se desarrolló este capítulo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se continuó analizando las 2 cepas endofíticas correspondientes a *T. amazonicum* y *A. strictum*, siendo las especies más frecuentes con potencial antagonista en *P. notatum* y *P. dilatatum* respectivamente (capítulo II). Esta selección de endofitos antagonistas se basó en los resultados del objetivo específico 2, en los antecedentes de efectos conocidos de especies fúngicas de los mismos géneros sobre el crecimiento de las plantas y el control de enfermedades en otras especies vegetales (Kelemu *et al.*, 2001; Larran *et al.*, 2016; Nandhini *et al.*, 2018). Dado que *T. amazonicum* fue aislado únicamente en *P. notatum* y *A. strictum* en *P. dilatatum*, cada endofito fue evaluado solamente en dicha especie vegetal.

---

### MATERIAL VEGETAL:

Se utilizaron plantas obtenidas de semillas *P. dilatatum* cv. Surenio y previamente escarificadas de *P. notatum* cv. Argentine y. Estos dos cultivares fueron seleccionados porque son los más populares de *P. notatum* tetraploide y *P. dilatatum* pentaploide respectivamente.

---

### MEDICIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS EN PLANTAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS CON EL HONGO ENDOFITO

#### Puesta a punto de un protocolo de obtención de plantas E- (libres de endofito) y E+ (infectadas)

Dado que la mayoría de los endofitos no clavicipitaceos son no sistémicos, de clase 3 y se transmiten horizontalmente formando infecciones locales durante períodos limitados de tiempo (Saikkonen *et al.*, 1998; Zabalgogezcoa *et al.*, 2013), se extremaron las medidas en el proceso de evaluación y se realizó el estudio en invernadero para un mejor control de las posibles contaminaciones fúngicas. El estudio se basó en Kleczewski *et al.* (2012) con mínimas modificaciones. Para poder realizar los estudios comparativos, fue necesario poner a punto un protocolo de obtención de plantas libres y con endofitos, tal como se describe a continuación.

Eliminación de endofitos: las semillas de ambas especies fueron almacenadas secas durante más de 3 meses antes de su uso. Kleczewski *et al.* (2012), han determinado que el tratamiento de semillas con agua caliente a 55°C durante 60 minutos, eliminó endofitos fúngicos de las mismas. Bajo este experimento, se siguió el mismo protocolo y las mismas pruebas de revisión con iguales resultados. Para evaluar el protocolo en *Paspalum*, primero realizamos la desinfección superficial como fue descrito en el capítulo II y luego, el tratamiento con agua caliente (55°C; 60 min) a una muestra de 20 semillas. Finalmente, las semillas tratadas se llevaron a incubación en placas con medio PDA durante 15 días, para



visualizar la existencia de crecimiento. Logrados los resultados esperados, de ausencia de crecimiento fúngico, se ejecutó este procedimiento a las semillas necesarias para el estudio siguiente.

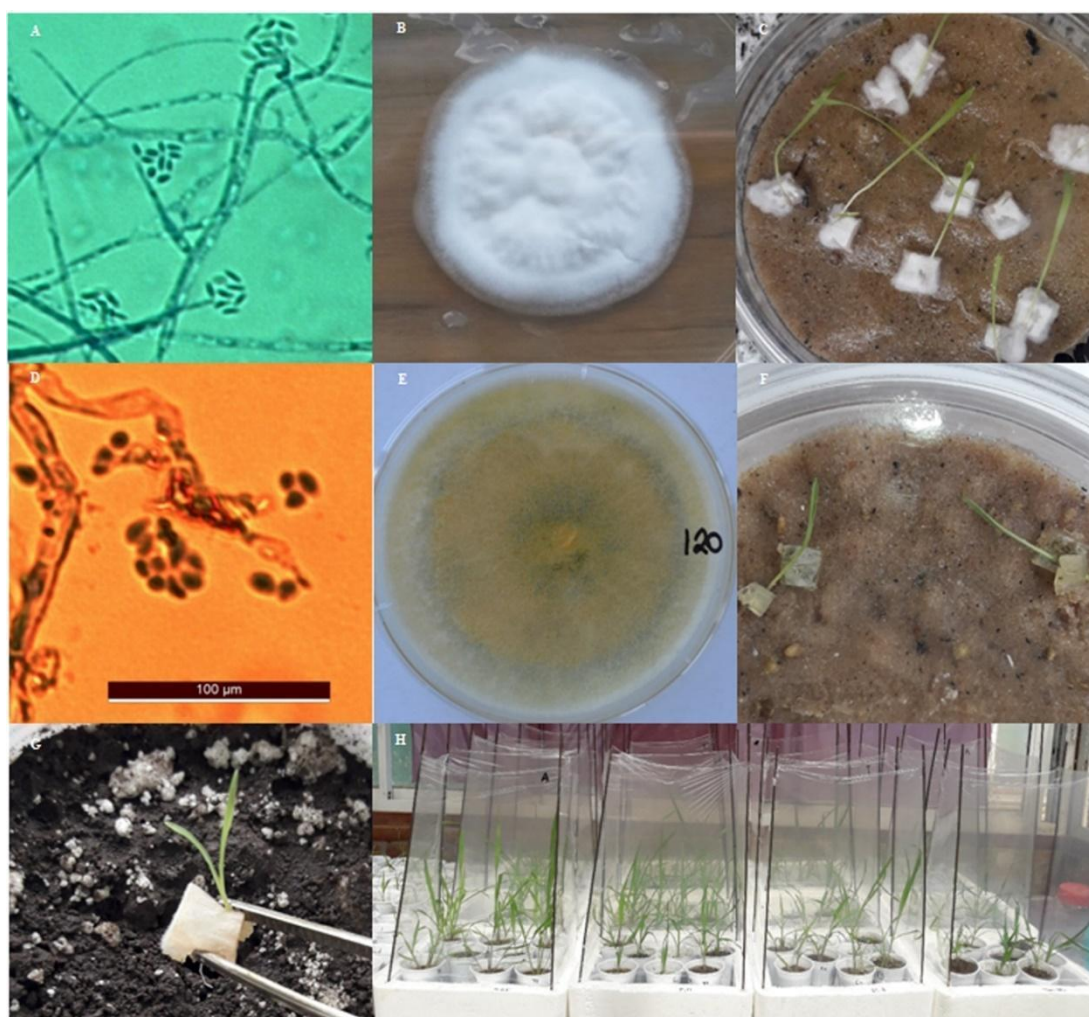
Germinación y desarrollo de plántulas libres de endofitos: para permitir realizar los estudios comparativos, dieciséis placas de Petri de vidrio con arena en su interior, fueron esterilizadas en autoclave. Luego, se sembró un total de 30 semillas en cada una de las 16 placas, correspondiendo a 480 semillas esterilizadas por especie vegetal. El objetivo fue obtener al menos ocho plantas para cada uno de los cuatro tratamientos: C1 = *P. notatum* sin endofito (Control) y T1 = *P. notatum* + *T. amazonicum* (Figura 28 F); C2 = *P. dilatatum* libre de endofitos (Control) y T2 = *P. dilatatum* + *A. strictum* (Figura 28 C). Las placas se regaron con agua destilada estéril y se colocaron en cámaras de luz con alternancia de 12 h de oscuridad y 12 h de luz (Depetris *et al.*, 2020).

Proceso de doble inoculación para obtener plantas infectadas con endofitos: cultivos de 7 y 10 días de los antagonistas en medio PDA se usaron para las inoculaciones (Figura 28 A, B, D y E). En cada especie vegetal, la mitad de las placas de Petri con plántulas libres de endofitos (es decir, ocho placas de dieciséis) fueron inoculadas dos veces con los antagonistas. La primera consistió en porciones de los micelios tomados desde los cultivos puros, estos se colocaron adyacentes a las plántulas en germinación en las placas con arena (Figura 28 C y F). Para reforzar este proceso, se realizó una segunda inoculación a los seis días de la primera. En una hoja de cada plántula se introdujo cuidadosamente una jeringa estéril con inóculo y se realizó la liberación del mismo. Las suspensiones de los endofitos (inóculo) se prepararon inundando las placas con los cultivos puros con agua destilada y luego frotando la superficie de las colonias con un bisturí, siempre todo estéril. La suspensión se agitó con vórtex, se filtró a través de una gasa mientras se transfería a un tubo falcón, finalmente se ajustaron las concentraciones con un hemocitómetro a 10<sup>6</sup> conidios/ml y por último se colocó una gota de Tween 20. Todo el proceso se realizó en una cámara de flujo laminar y dos veces para optimizar la colonización de las plántulas por los endofitos seleccionados (Depetris *et al.*, 2020).

### Medición de parámetros agronómicos

Con el fin de evaluar el efecto potencial de los endofitos en el crecimiento, y por consiguiente en la producción de forraje, se realizó el ensayo en condiciones controladas en invernadero. El estudio se basó en Kleczewski *et al.* (2012) con mínimas modificaciones, y fue publicado en Depetris *et al.* (2020).

Trasplante y reducción de la contaminación cruzada: se comenzó elaborando un sistema de cámaras que permitieron aislar los tratamientos con diferentes infecciones endofitas y reducir posibles contaminaciones. Para ello, se desarrollaron estructuras con base de telgopor, paredes de papel film transparente de 45 cm de alto y techo abierto (Figura 28 H). El diseño fue en bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones (cuatro tratamientos por réplica, ocho plantas por tratamiento, Figura 28 H). Se utilizaron macetas individuales con suelo estéril y perlita (Figura 28 G), donde se trasplantaron mediante el aislamiento de las mismas desde las placas de Petri, utilizando pinzas estériles, un total de 24 plántulas inoculadas. Luego, se colocaron en dichas cámaras que estaban situadas en un invernadero a una temperatura promedio de 28°C. Las plantas se regaron diariamente hasta la capacidad de campo con agua estéril y se realizaron inoculaciones adicionales semanalmente, por aspersion. Esto permitió optimizar los efectos potenciales de los endofitos en relación a los controles (Depetris *et al.*, 2020).



**Figura 28.** Conidios, colonia e inoculación de plántulas con porción micelial de *A. strictum* (A, B, C); conidios, colonia e inoculación de plántulas con porción micelial de *T. amazonicum*

(D, E, F); trasplante con pinzas a macetas individuales con suelo estéril y perlita (G); cámaras para reducir la contaminación cruzada (H) (Depetris *et al.*, 2020).

Evaluación de posibles efectos en el crecimiento vegetal: después de seis semanas de desarrollo de las plantas en las cámaras realizadas, se finalizó el análisis con la determinación de varios parámetros agronómicos. Para ello, se contabilizaron las hojas en el tallo principal, las hojas completamente desplegadas y sin desplegar, los macollos y se midió la altura de la planta (cm), la longitud (cm) y ancho (mm) de la hoja más joven completamente expandida (unión visible entre lámina y vaina), el contenido relativo de clorofila (SPAD) y la materia seca aérea y radical (g).

El contenido relativo de clorofila se determinó utilizando un dispositivo denominado MultispeQ y el software PhotosynQ. Este, es un instrumento científico de bajo costo y de código abierto diseñado para medir en condiciones ambientales de campo o laboratorio, parámetros fotosintéticos, contenido de clorofila foliar y otros pigmentos. Los datos se transmiten desde MultispeQ a dispositivos móviles, computadoras portátiles o computadoras de escritorio junto con metadatos clave que se guardan en la plataforma PhotosynQ y proporcionan herramientas para sus análisis (Kuhlgert *et al.*, 2016). Para la determinación de la biomasa, el tejido se lavó con agua corriente y se secó en estufa hasta peso constante.

Análisis de datos: el diseño fue en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Cada bloque incluía ocho plantas por tratamiento y había cuatro tratamientos (32 plantas por bloque). La prueba de Shapiro-Wilks se realizó para evaluar la normalidad del conjunto de datos. La importancia de los efectos endofitos se probó estadísticamente con la prueba t- Student para los datos distribuidos normalmente. La prueba de Wilcoxon se realizó cuando los datos no se distribuyeron normalmente (número de hojas, número de hojas desplegadas, número de hojas sin desplegar, altura y número de macollos). Las diferencias entre tratamientos se determinaron utilizando un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se realizaron con InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

---

## EVALUACIÓN DEL CONTROL DE ERGOT *IN PLANTA*:

Complementando las evaluaciones del potencial biocontrolador de los endofitos *in vitro* (objetivo específico 2, capítulo III) y con el fin de reforzar los resultados obtenidos, se realizaron evaluaciones *in vivo* (objetivo específico 3) frente al patógeno fúngico *C. paspali* (ergot).

Material biológico y tratamientos: para este estudio se utilizaron los mismos cultivares descritos anteriormente para cada especie vegetal con su correspondiente endofito en

estudio. Se llevaron a cabo los 3 tratamientos (T) siguientes, basados en Larran *et al.* (2016) con modificaciones menores:

\*T1 (potencial control endofito): inóculo del endofito aplicado en 3 momentos, principalmente debido a la falta de sincronía fenológica de las plantas en su totalidad. La primera inoculación se realizó un mes posterior al trasplante a campo y previo a antesis (13/12/19), la segunda unos pocos días después fue para reforzar el proceso dado que luego de la primera ocurrió una fuerte tormenta (17/12/19) y finalmente una última en post antesis (9/1/19).

\*T2 (control negativo): plantas sanas con aplicación de fungicida preventivo y curativo junto a la primera inoculación previo a antesis (13/12/19) y una segunda en post antesis (9/1/19) (Rios *et al.* 2015).

\*T3 (control positivo): plantas en condiciones naturales de infestación.

Obtención de plantas: en bandejas con tierra estéril se sembraron semillas de cada especie en julio de 2019. Los plantines obtenidos fueron trasplantados en bandejas de plantación (speedlings), 2 semanas después de la emergencia. Finalmente, fueron trasplantadas en el campus de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, a mediados de octubre del mismo año como plantas individuales. Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado (DBCA) con 6 repeticiones y 3 tratamientos, lo que resultó en un total de 18 plantas de *P. notatum* cv Argentine, e igual cantidad para *P. dilatatum* cv. Surenio. El ensayo consistió en una parcela de 10 m x 5 m (Figura 29).

PN T1	PD T3	PN T2	PD T3	PN T1	PD T2	PD T1	PN T2	PN T3
PD T2	PD T1	PN T3	PN T2	PD T2	PN T3	PD T2	PN T1	PD T3
PD T1	PN T1	PD T3	PN T3	PD T2	PN T1	PN T2	PD T3	PN T1
PN T2	PN T3	PD T1	PN T2	PD T1	PD T3	PN T3	PD T1	PD T2

Referencias:

<i>P. notatum</i>
<i>P. dilatatum</i>

**Figura 29.** Distribución de parcelas correspondientes al DBCA para en el ensayo de evaluación del control de *C. paspali in vivo*.

Para lograr eliminar hongos endofitos para luego realizar los estudios comparativos posteriores, se efectuó una aplicación con Bayleton WP de Bayer, fungicida sistémico para el control de enfermedades fúngicas. El principio activo es Triadimefon formulado como polvo mojable. La aplicación se realizó el 11 de noviembre de 2019 previo a antesis, según dosis de marbete (30 g / 100 m<sup>2</sup>). A fin de evaluar la calidad de la erradicación de hongos, muestras de tejido vegetal de 6 plantas seleccionadas al azar fueron cultivadas *in vitro* en medio de cultivo PDA tal como fue descripto en el capítulo II.

Preparación del inóculo: se utilizaron cultivos del antagonista a evaluar en medio PDA de entre 7 y 10 días de crecimiento. Las suspensiones de los endofitos se prepararon inundando las placas con agua destilada y luego frotando las colonias con un bisturí, siempre todo estéril. La suspensión se agitó con vórtex, se filtró a través de una gasa mientras se trasvasó a un tubo tipo falcon, finalmente se ajustaron las concentraciones con un hemocitómetro a 10<sup>6</sup> conidios/ml y por último se colocó una gota de Tween 20 (Larran *et al.*, 2016).

Inoculaciones: fueron realizadas cuando la parcela no estaba sometida a estrés térmico, después de las 17:30 h, los días 13 y 17 de diciembre de 2019 y 9 de enero de 2020 (pre antesis y post antesis). Utilizando un pulverizador de presión, se inocularon las plantas correspondientes a los tratamientos T1 de ambas especies vegetales, rociando con la suspensión de esporas a las plantas/inflorescencias hasta que se observaban pequeñas gotas sobre los tejidos. Luego, se cubrieron inmediatamente con una bolsa de plástico durante 48 h (Figura 30 A), para mantener su humedad (Larran *et al.*, 2016). Además, el área contaba con una media sombra de 90% de manera de generar un ambiente más favorable para el desarrollo de los hongos. Una vez retirada la cámara húmeda, se retiró la media sombra, este procedimiento se repitió en todas las inoculaciones (Figura 30 B). En la primera y última fecha, también se aplicó según dosis de marbete, Consist WG de Bayer (tebuconazole + trifloxystrobin), fungicida residual formulado como granulado dispersable, para obtener plantas sanas correspondientes al tratamiento control (T2).

Actividades de mantenimiento: se realizaron labores periódicas de limpieza de malezas con azada y fertilizaciones con Fertifox líquido soluble, el cual contiene nitrógeno, fósforo y potasio (18-1-4). Se efectuaron dos aplicaciones según la dosis especificada por el proveedor, el 17 de noviembre y 6 de diciembre.





**Figura 30. A:** tejidos inoculados cubiertos con bolsa plástica durante 48 h y media sombra para mantener su humedad. **B:** lote bajo estudio 48 h post inoculación.

#### Evaluaciones agronómicas:

- 1) La severidad es una estimación visual en la cual se establecen grados de infección en una determinada planta, sobre la base de la cantidad de tejido vegetal enfermo. Es subjetiva y hace referencia al porcentaje del área necrosada o enferma. En este caso, corresponde a las semillas ubicadas en las inflorescencias y se evaluó a través de la cobertura de cada semilla con la exudación azucarada característica.

Este porcentaje de severidad se determinó utilizando una escala visual estableciendo categorías del 1 a 5, donde: 1 = no visible, 2 = <10%, 3 = 11 a 50%, 4 = 51 a 80%, y 5 = > 80% de la cobertura de la semilla completamente cubierta con exudado y/o esclerocios (Rios *et al.*, 2015). Las evaluaciones en *P. notatum* fueron realizadas el 2/1; 7/1; 22/1; 30/1 y 7/2 del año 2020. En *P. dilatatum* se hicieron a partir del 22/1 ya que previamente no se manifestó la enfermedad.

- 2) Después de clasificar visualmente las parcelas para determinar la severidad del cornezuelo, las inflorescencias con cariopses maduros se fueron cosechando recortando con tijera y colocando en bolsa de papel por tratamiento. Se secaron a temperatura ambiente por una semana y finalmente se trillaron a mano. Utilizando un soplador especial (Seedburo Equipment Company, 1022 w), las flores vacías y otros materiales inertes fueron eliminados, separando en semillas llenas y vacías.

Se pesó el total de semillas llenas y vacías y la suma se nombró como Peso total (Peso total lleno + Peso total vacío = Peso total).

Para determinar el peso promedio de 100 semillas llenas por cada tratamiento, se contaron 100 semillas, se pesaron y este procedimiento fue realizado 3 veces para

determinar el promedio. Luego se calculó el número total de semillas llenas (Peso total lleno \* 100 / peso promedio de 100 semillas llenas). Lo mismo fue realizado para la determinación del peso promedio de 100 semillas vacías y el número total de semillas vacías por tratamiento.

Posteriormente se determinó el número total de semillas como el número total de semillas llenas + número total de semillas vacías. Finalmente se utilizó para realizar comparaciones entre tratamientos el porcentaje de semillas llenas o de llenado (número total de semillas llenas \* 100 / número total de semillas).

- 3) El porcentaje de incidencia de la enfermedad se determinó mediante determinación visual y por tratamiento con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Para la evaluación visual, se contó manualmente y bajo lupa, el número de cariopses infectados con ergot en una muestra de 100 semillas llenas. La cantidad de semillas con signos de la enfermedad indicaron el porcentaje de incidencia visual (Rios *et al.*, 2015).

Luego, cada grupo de 100 semillas evaluado bajo lupa, fue tratado con ácido sulfúrico en tubos tipo falcon de 15 ml y en agitación. Las semillas de *P. notatum* permanecieron durante 50 minutos, mientras que las de *P. dilatatum* solo 35 minutos para adecuarlo al menor grosor de glumas. Las semillas de los tubos se lavaron luego en vasos de precipitados con agua, se separaron vertiendo el contenido del mismo a través de un tamiz de malla fina; y luego extendiéndolas sobre toallas de papel debidamente etiquetadas. Una vez secas, cada muestra se frotó ligeramente entre los dedos para eliminar los restos de glumas y glumelas. Las cariopses sanos contados fácilmente y separados de los de forma irregular fueron restados de 100 dando el porcentaje de incidencia en cada muestra. No se puede hacer un recuento directo de los las enfermas porque algunas de ellas son completamente destruidas por el ácido (Burton, 1945). Este último porcentaje fue utilizado únicamente para determinar el número de semillas llenas sanas entre tratamientos, para poder determinar el principal efecto de los endofitos en la producción de semillas. Se realizaron los siguientes cálculos en 1000 semillas.

Nº de semillas llenas = Porcentaje de semillas llenas/100 \* 1000.

Nº de semillas llenas con ergot = Nº de semillas llenas \* % de incidencia con ácido/100.

Nº de semillas llenas sanas = Nº de semillas llenas - Nº de semillas llenas con ergot.

También se determinó el porcentaje de llenado corregido según la incidencia alcanzada mediante el tratamiento con ácido sulfúrico. Para esto se hizo el cálculo siguiente:  
Porcentaje de llenado corregido = Nº de semillas llenas sanas \* 100/1000.



Finalmente, se determinaron los pesos en kg de semillas. Para ello se realizaron las siguientes determinaciones:

Peso semillas llenas = N° de semillas llenas \* peso promedio de 1000 semillas llenas/1000

Peso semillas vacías = (1000 - N° de semillas llenas) \* peso promedio de 1000 semillas vacías/1000

Peso total (1000 semillas) = Peso semillas llenas + Peso semillas vacías

Peso semillas llenas sanas = N° de semillas llenas sanas \* peso promedio de 1000 semillas llenas/1000

Kg de semillas llenas sanas en 100 kg de semillas = Peso semillas llenas sanas \* 100 / Peso total (1000 semillas)

Análisis de datos: se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizados con 6 repeticiones y 3 tratamientos, lo que resultó en un total de 18 plantas de *P. notatum* cv Argentine, e igual cantidad para *P. dilatatum* cv Surenio. Para los valores de severidad que correspondían a valores entre 1 y 5, se utilizó el logaritmo decimal (Log base 10). La prueba de Shapiro-Wilks se realizó para evaluar la normalidad del conjunto de datos. Dado que los valores se distribuyeron normalmente, se compararon mediante ANOVA de 2 factores y luego fue efectuado como test de comparación de medias la prueba de Mínima Diferencia Significativa (LSD de Fisher). Las diferencias entre tratamientos se determinaron utilizando un nivel de significancia del 5%, con el paquete estadístico InfoStat versión estudiantil (Di Rienzo *et al.*, 2018).

## RESULTADOS

### MEDICIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS EN PLANTAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS CON EL HONGO ENDOFITO

#### Protocolo de obtención de plantas E- y E+

Se determinó que las semillas esterilizadas superficialmente, tratadas con agua caliente por 60 minutos y cultivadas en medio PDA durante 15 días a 28°C, estaban libres de endofitos (plantas E-). Estas mismas semillas, fueron germinadas exitosamente en cámara de luz y la mitad de ellas fueron doblemente inoculadas con sus endofitos correspondientes por especie (E+), tanto en *P. notatum* como *P. dilatatum*. De esta manera, se obtuvieron plantas libres de endofitos (E-) y con endofitos (E+) para los estudios comparativos de comportamiento agronómico.

#### Medición de parámetros agronómicos

Se cuantificaron variables de crecimiento en plantas infectadas (E+) y sin endofitos (E-), determinando que el crecimiento en *Paspalum* fue promovido a través de diferentes parámetros por los distintos hongos endofitos.

Las plantas de *P. dilatatum* infectadas con *A. strictum* presentaron valores medios mayores que las libres de endofito y con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para las siguientes variables: número de macollos, materia seca aérea y radicular (Tabla 9). Los parámetros que no se vieron afectados por la infección de endofitos son: el número de hojas en el tallo principal, las hojas desplegadas y sin desplegar, la altura de la planta, el largo y el ancho de la hoja más joven completamente expandida y el contenido relativo de clorofila (Tabla 9).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas y mayores en el contenido relativo de clorofila ( $p < 0.05$ ) en plantas de *P. notatum* infectadas con *T. amazonicum*, en comparación con las plantas libres del mismo. Los siguientes parámetros no fueron estadísticamente diferentes: número de hojas en el tallo principal, desplegadas y sin desplegar, número de macollos, altura, longitud y ancho de la hoja más joven completamente expandida, materia seca aérea y radicular (Tabla 9).

A continuación, se describe en modo de tabla, el resumen de las salidas de los análisis estadísticos de las evaluaciones realizadas.

**Tabla 9.** Resultados del análisis estadístico de las variables asociadas al comportamiento agronómico en especies de *Paspalum*:

	<i>Paspalum notatum</i>					<i>Paspalum dilatatum</i>				
	Media E+	DE	Media E-	DE	DME	Media E+	DE	Media E-	DE	DME
	Wilcoxon				LSD	Wilcoxon				LSD
Nº Hojas	4,4	0,6	4,7	0,6	0.30241	4	0,6	4	0,5	0.30241
Nº Desplegadas	2	0,5	2,1	0,5	0.29804	2,6	0,5	2,5	0,5	0.29804
Nº No despl.	2,4	0,5	2,5	0,5	0.29804	1,4	0,5	1,5	0,5	0.29804
Altura (cm)	21,6	6,1	20,6	4,5	386.473	27,3	6,6	24,6	6,6	386.473
Nº Macollos	3,5	1,3	3	0,9	0.61842	4	1,1	3,1	1	<b>0.6184*</b>
	t-Student				LSD	t-Student				LSD
Long hoja (cm)	19,4	3,7	19,5	3,2	293.509	22,5	5,1	19,6	4,8	293.509
Ancho (mm)	6,2	1	6,6	1	0.71149	7,8	1	7,4	1,5	0.71149
SPAD	30,8	6,1	25,8	7,3	<b>2.8954*</b>	25,3	5	24,8	5	289.548
MS raíz (g)	0,3	0,1	0,3	0,1	0.08741	0,5	0,1	0,4	0,2	<b>0.0874*</b>
MS aérea (g)	0,4	0,1	0,5	0,1	0.08396	0,5	0,2	0,4	0,1	<b>0.0839*</b>

E+ = plantas inoculadas con el endofito; E- = plantas libres de endofitos; DE = desvío estándar; DME = diferencia de medias estandarizada, prueba de LSD Fisher. Las diferencias significativas se indican con \* ( $p < 0.05$ ).

#### EVALUACIÓN DEL CONTROL DE ERGOT *IN PLANTA*:

En *P. dilatatum*, en las dos primeras fechas no se manifestó desarrollo de la enfermedad, por lo tanto, su valor de medición de severidad fue de 1 (no visible). Cuando se manifestaron los signos de la enfermedad, los valores difirieron entre tratamientos.

En *P. notatum*, las evaluaciones mostraron presencia de enfermedad entre los tratamientos en todas las fechas analizadas.

**Tabla 10.** Resultados de la determinación visual de la severidad: ID (Identificación), Rep (número de repetición), PD (*P. dilatatum*), PN (*P. notatum*), T1 (Inoculado con endofita), T2 (Control negativo = fungicida), T3 (Control positivo = condiciones naturales), % Sev. (Porcentaje de severidad).

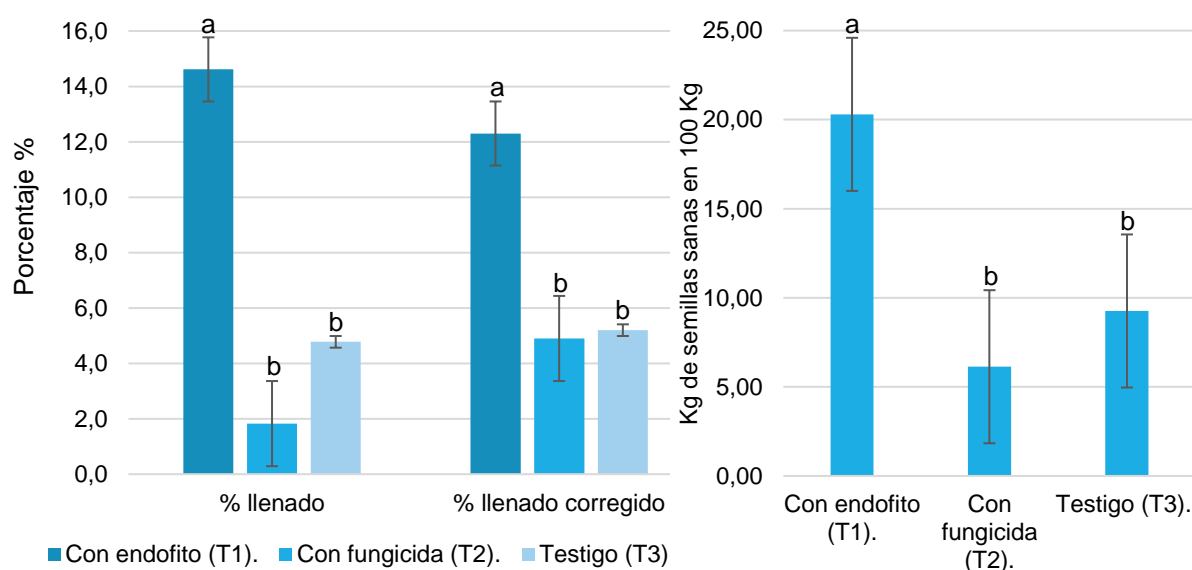
ID	Rep	FECHAS							
		13/12/2019	17/12/2019	% Sev. 2/1	% Sev. 7/1	9/1/2020	% Sev. 22/1	% Sev. 30/1	% Sev. 7/2
PD T1	1	Inoculación endofita	Inoculación endofita	1	1	Inoculación endofita	3	2	2
	3			1	1		3	3	3
	4			1	1		2	3	3
	5			1	1		2	2	3
	4			1	1		3	2	2
	6			1	1		2	4	4
PD T2	1	Fungicida		1	1	Fungicida	2	2	3
	2			1	1		1	4	2
	2			1	1		1	3	3
	3			1	1		2	3	3
	5			1	1		1	4	3
	6			1	1		1	4	2
PD T3	1			1	1		3	3	5
	2			1	1		2	2	3
	3			1	1		1	2	4
	4			1	1		2	4	3
	5			1	1		3	5	3
	6			1	1		2	3	3
PN T1	1	Inoculación endofita	Inoculación endofita	1	1	Inoculación endofita	1	4	3
	2			1	2		1	1	3
	3			1	3		1	3	4
	4			1	2		1	1	2
	5			1	2		1	1	2
	6			1	2		1	1	2
PN T2	1	Fungicida		1	1	Fungicida	3	2	2
	2			1	1		1	2	2
	3			3	2		2	4	4
	4			3	2		1	1	2
	5			1	2		1	1	4
	6			1	1		2	1	2
PN T3	1			3	3		2	3	2
	2			1	1		2	1	2
	3			1	2		1	2	2
	4			1	2		3	1	3
	5			1	2		1	2	3
	6			1	1		4	2	3

Luego de la determinación del porcentaje de severidad de la enfermedad, incidencia y semillas llenas, los resultados de los análisis estadísticos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ambas especies en los momentos de evaluación detallados a continuación.

*Paspalum dilatatum:*

El porcentaje de severidad visual para la fecha del 22-1, fue mayor y con diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento 1 (T1 = plantas inoculadas con *A. strictum*) y el testigo (T3), respecto a T2 (tratado con fungicida). En relación al porcentaje de incidencia visual, no hubo diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las fechas evaluadas.

En la figura 31 para las mismas fechas, podemos visualizar que cuando nos centramos en el porcentaje de llenado, en el tratamiento con endofito (T1) fue mayor respecto del resto. Este valor no diferencia entre llenas sanas y enfermas, por lo que se agregó el cálculo de porcentaje de llenado corregido en base a la incidencia con ácido sulfúrico (número de semillas sanas corregido) y los kg de semillas sanas en 100 kg de semillas. Estos valores fueron significativamente mayores en presencia del endofito (T1) comparado con el tratamiento de fungicida (T2) y el testigo (T3). Se pudo ver que no existieron diferencias entre los tratamientos 2 y 3, pero el número de semillas llenas sanas en el tratado con endofito (T1) fue 2,5 veces mayor que T2 y 2,35 veces superior respecto a T3.

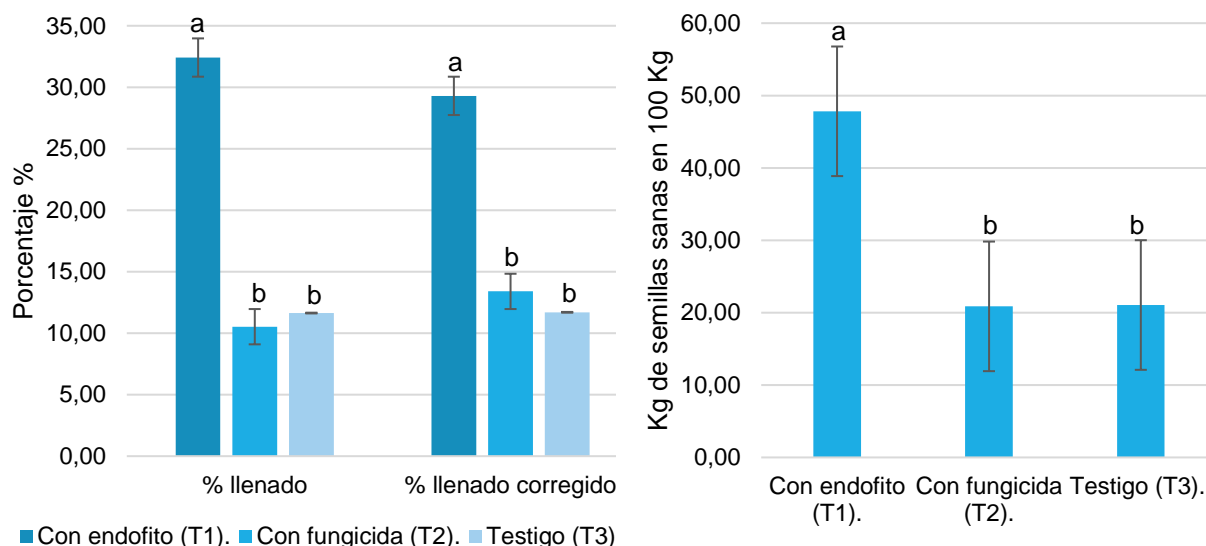


**Figura 31.** Resultados de porcentaje de llenado, de llenado corregido a partir de incidencia en ácido sulfúrico y kg de semillas sanas en 100 kg de semillas de *P. dilatatum* para los tratamientos T1 (*A. strictum*), T2 (fungicida) y T3 (testigo). Las barras verticales indican el error estándar de la media. Los valores medios con una letra común no son significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de 0,05%.

#### *Paspalum notatum*:

Los porcentajes de severidad e incidencia visual no mostraron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos en los momentos analizados. En la figura 32 podemos visualizar que para el 9-1, el porcentaje de llenado en el tratamiento con endofito (T1 = plantas inoculadas con *T. amazonicum*), fue mayor y significativo respecto al resto de los tratamientos. El cálculo de porcentaje de llenado corregido en base a la incidencia con ácido sulfúrico (número de semillas sanas corregido) de la enfermedad y kg de semillas

sanas en 100 kg de semillas, también los valores fueron significativamente mayores en presencia del endofito (T1) comparado con el tratamiento de fungicida (T2) y el testigo (T3). Se pudo ver que no existieron diferencias entre los tratamientos 2 y 3 pero el número de semillas llenas sanas en el tratado con endofito (T1) fue 2,19 veces mayor que T2 y 2,5 veces superior a T3.



**Figura 32.** Resultados de porcentaje de llenado, de llenado corregido a partir de incidencia en ácido sulfúrico y kg de semillas sanas en 100 kg de semillas de *P. notatum* para los tratamientos T1 (*T. amazonicum*), T2 (fungicida) y T3 (testigo). Las barras verticales indican el error estándar de la media. Los valores medios con una letra común no son significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de 0,05%.

Como resultado general, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en presencia de los dos endofitos evaluados para ambas especies de *Paspalum*, mostrando que parecen promover la producción de semillas llenas (% de llenado), el número de semillas llenas sanas (Nº de semillas sanas en 1000) o % de llenado corregido (Nº de semillas llenas sanas \* 100/1000) y el peso (kg de semillas sanas en 100 kg de semillas). De esta manera, las plantas con endofitos fueron más productivas que las plantas libres. Los resultados sugerirían que las plantas E+ podrían tener una ventaja selectiva sobre las plantas E- (Clay, 1987).

## DISCUSIÓN

A causa de la interacción con hongos endofitos, ocurren cambios fisiológicos dentro de las plantas. Dentro de los beneficios reportados encontramos: incremento en la tasa fotosintética, en la absorción de fosfatos en planta, tolerancia a estrés salino, aumento en el crecimiento y resistencia a organismos patógenos (Clay, 1998; Bacon y White, 2000; Compant *et al.*, 2005; Gamboa *et al.*, 2006; Gundel *et al.*, 2013; Patle *et al.*, 2018).

En este capítulo, se focalizó en el análisis de los efectos de los endofitos aislados en el crecimiento (midiendo parámetros agronómicos) y sobre patógenos fúngicos causantes de enfermedades (*in vivo*).

---

### MEDICIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS

Dentro de los resultados hallados, *T. amazonicum* promovió significativamente el contenido relativo de clorofila en plantas de *P. notatum* (Tabla 9) en comparación con plantas libres del mismo.

Las especies del género *Trichoderma*, son hongos asexuales que están presentes en todo tipo de suelos agrícolas, en madera en descomposición y en algunas especies como endofito (Ghazanfar *et al.*, 2018). Dado que es un género fúngico ampliamente difundido en el suelo, la mayoría de sus estudios se encuentran asociado a aplicaciones al suelo más que a la parte aérea.

Existen reportes de resultados similares a los hallados en este estudio, donde en un experimento de campo se evaluó la viabilidad de inocular plántulas de arroz con biofertilizantes a base de *Trichoderma sp.*. En consecuencia, las plantas contenían concentraciones más altas de clorofila cuando se trataban con este producto y el uso de esta especie como endofito se tradujo a su vez, en un mayor rendimiento del cultivo (Khan, 2018). Otro reporte reciente y congruente con este resultado se encontró en el cultivo de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*), donde las inoculaciones con *T. harzianum* mejoraron el contenido de clorofila y el área foliar de los cultivos en maceta (Devedee *et al.*, 2020). Por otro lado, la colonización con *T. virens* dio como resultado un aumento, casi del doble, de las tasas de fotosíntesis de las plantas de maíz, medidas por la absorción de CO<sub>2</sub> de las plantas inoculadas en relación con la de los controles no inoculados (Vargas *et al.*, 2009).

Determinadas cepas de *Trichoderma* en plantas sometidas a estrés, activan vías bioquímicas que reducen los daños en los fotosistemas y procesos celulares involucrados en la fotosíntesis. Este y otros mecanismos hacen que las plantas sean más resistentes al estrés biótico y abiótico. Afortunadamente, cuando las raíces de las plantas son colonizadas



por ciertos hongos endofíticos de raíces del género *Trichoderma*, se induce una regulación positiva de genes y pigmentos que mejoran la fotosíntesis de las plantas (Harman *et al.*, 2019). Es posible que esta regulación positiva de pigmentos consecuencia de la inoculación con este género endofito en plantas de *P. notatum*, haya estado involucrado en el efecto de mayor cantidad de clorofila observado en las plantas inoculadas.

Con el fin de mejorar el crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas, se han formulado bioestimulantes con diversos microorganismos que son seguros para los seres humanos, el ganado y las plantas de cultivo. Los productos a base de *Trichoderma* han sido particularmente exitosos en horticultura por su capacidad para controlar hongos fitopatógenos y por su acción bioestimulante. El mecanismo de fitoestimulación con *Trichoderma* implica la comunicación multinivel dentro de los sistemas de raíces y brotes. Los datos proteómicos y genéticos sugieren que *Trichoderma* activa una proteína quinasa, factores de transcripción y proteínas de procesamiento de ADN, que representan objetivos prometedores hacia la formulación de productos más eficientes y amigables con el medio ambiente (López-Bucio *et al.*, 2015).

En esta tesis, las plantas de *P. dilatatum* mostraron un número significativamente mayor de macollos y materia seca (aérea y radical) en presencia de *Acremonium strictum*, que las plantas control sin endofito (Tabla 9). Numerosos reportes indican que los endofitos pueden producir compuestos que promueven el crecimiento de las plantas o las ayudan a adaptarse al entorno cambiante. Evidentemente, la síntesis de metabolitos fúngicos ha contribuido a las diferencias encontradas en plantas infectadas.

Existen reportes similares en raigrás cv. Nui (*Lolium perenne*), donde el área total de la hoja y los macollos por planta fueron significativamente mayores en presencia de *Acremonium sp.*. Las plantas infectadas con *Epichloë lolii* (anteriormente *Acremonium loliae*) también produjeron 38% más de materia seca total que los controles (Latch *et al.*, 1985). En estudios realizados en ajeno dulce (*Artemisia annua* L.), se identificaron endofitos utilizando métodos taxonómicos convencionales y moleculares. Las plantas tratadas con un extracto inductor preparado a partir de *Acremonium persicum*, mostraron un aumento en el área de la hoja, el contenido de artemisinina y la biomasa vegetal en comparación con las plantas control (Hussain *et al.*, 2017). En un estudio en invernadero donde se evaluó la respuesta de la planta huésped de festuca alta (*Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort) a la infección endofita por *A. coenophialum* (actualmente *Epichloë coenophiala*), demostró que la producción de materia seca por macollo y el área foliar fue mayor en las plantas infectadas en comparación con las plantas libres de endofitos (Hill *et al.*, 1990).

Por otro lado, existen informes con ambos géneros aquí estudiados, donde el tratamiento de semillas con *Trichoderma asperellum* y *Acremonium sp.* aumentó la germinación, el vigor de las plántulas y la emergencia en mijo perla (*Pennisetum glaucum* L.). Además, ambos microorganismos redujeron significativamente la infección por mildiu desde 89% a 36% (Nandhini *et al.*, 2018).

El experimento realizado en invernadero sugiere beneficios para el crecimiento del pasto y, por lo tanto, se podría esperar que la infección endofita fuera mayor en las plantas de un pastizal intensamente pastoreado. Aunque la presencia de los endofitos promovió el número de macollos y la biomasa en el experimento en invernáculo, la frecuencia endofita fue baja en los pastizales evaluados. Muchos factores secundarios pueden estar evitando una mayor frecuencia, sin embargo, una mayor biomasa, un mayor contenido relativo de clorofila y un mayor número de macollos generalmente están relacionados con una mayor fertilidad del suelo, particularmente nitrógeno (Saikkonen *et al.*, 1998).

Posiblemente, el efecto encontrado en condiciones de invernadero sea un beneficio potencial encontrado en ese contexto particular, según lo informado por Gundel *et al.* (2013), los beneficios de la interacción endofito planta, parecen ser altamente dependientes del cultivo hospedante, la cepa endofítica y las condiciones ambientales. Quizás, la baja frecuencia de la infección de endofitos en pastizales observada en el presente estudio, sea consecuencia de las condiciones ambientales. Para confirmar esta hipótesis, serán necesarios más experimentos en condiciones de campo y en presencia de ganado.

---

#### EVALUACIÓN DEL CONTROL DE ERGOT *IN PLANTA*:

*Claviceps paspali* es un hongo que infecta con frecuencia a gramíneas del género *Paspalum* (Alderman *et al.*, 2004). El ciclo de infección de este hongo comienza con esporas sexuales (ascosporas) propagadas por el viento (Alderman, 2003) o posiblemente por insectos (Brown, 1916; Feldman *et al.*, 2008). El patógeno infecta el pistilo de la flor en el momento de la floración colonizando los estilos de plantas susceptibles y pocos días después el contenido del ovario es reemplazado por tejido fúngico (Brown, 1916). El signo de la infección aparece en la antesis cuando se produce un exudado rico en azúcar (melaza) en las flores infectadas. Esto hace que las semillas se sientan pegajosas y los exudados son los que contienen las esporas asexuales (conidios) responsables de iniciar infecciones secundarias. El desarrollo de la enfermedad se correlaciona con las condiciones ambientales de alta humedad, días nublados y temperaturas cálidas, después de lo cual el ciclo de la enfermedad termina formando una masa de tejido fúngico oscuro (escleroto) que

reemplaza la semilla y separa las glumas. Además, la semilla infectada contiene alcaloides que son tóxicos para los animales (Brown, 1916; Villar, 1984).

A medida que avanza la enfermedad en plantas susceptibles, aparecen síntomas en el hospedante. Se cree que la gravedad de estos síntomas depende de la susceptibilidad genética del huésped, la virulencia del patógeno y el entorno abiótico propicio para la infección. La hipótesis cada vez más aceptada refleja que los endofitos son en gran medida modificadores de la gravedad de la enfermedad de la planta huésped, el mecanismo no está claro. Los estudios publicados en la literatura demuestran una gama completa de interacciones entre plantas, hongos endofitos y patógenos. Los más conocidos son los efectos de antagonismo de patógenos por hongos endofitos, pero existen interacciones neutrales y de facilitación de patógenos causantes de enfermedades. La modificación de la enfermedad de las plantas depende del contexto, según el entorno abiótico y biótico (ambiente), la planta huésped y el patógeno (triángulo de la enfermedad). En otras palabras, la inoculación con el mismo endofito puede tener diferentes efectos sobre la gravedad de la enfermedad (Busby *et al.*, 2015). Los factores ambientales como la temperatura, el pH y la humedad influyen en la actividad fúngica (Cook y Baker 1983) y, por lo tanto, también deberían influir en la modificación de la enfermedad por los endofitos. Esto explicaría porque el mismo endofito podría afectar de manera diferente la severidad de la enfermedad causada por dos patógenos diferentes (manteniendo constante la planta huésped) (Busby *et al.*, 2015). Incluso, la función ecológica de los endofitos también puede variar dentro de una especie de hongo. Por ejemplo, los aislados de *Trichoderma atroviride* variaron en el antagonismo de tres patógenos diferentes del raigrás: *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Sclerotinia trifoliorum* (Kandula *et al.*, 2015).

Las interacciones entre endofitos y patógenos que facilitan el desarrollo de enfermedades no están bien estudiadas. Los patógenos podrían aprovechar los metabolitos endofitos para permitir su propia virulencia (Pruss *et al.*, 1997). Aparentemente, podrían suprimir las defensas del huésped para permitir su propia infección, facilitando así la infección de los patógenos coexistentes (Houterman *et al.*, 2008; Bonello *et al.*, 2008).

La producción de semillas es un componente crítico en los sistemas agrícolas basados en *P. notatum* y se ha informado que ergot reduce significativamente la calidad de las semillas en los cultivares tetraploides (Rios *et al.*, 2015). Según Burton (1942), durante condiciones soleadas, cálidas y de baja humedad, se necesitan de cuatro a seis días para completar la antesis en cualquier racimo en *P. notatum* y, en general, menos de la mitad de las flores en cualquier racimo se abren en un período de 24 h. En sus estudios, las semillas

que se habían recolectado antes de la antesis no mostraban signos o síntomas de infección; sin embargo, las recolectadas en antesis y post antesis presentaron síntomas.

La determinación de la cantidad de ergot en plantas de *Paspalum* se ve dificultada por reacciones del parásito y su hospedador. La infección inicial de las flores está marcada por la formación de mucho exudado pegajoso que generalmente cubre la mayoría de las flores en una panícula (Burton, 1945). En la evaluación realizada en este estudio en *Paspalum*, la severidad fue determinada visualmente (Rios *et al.*, 2015) y el resultado obtenido demostró que únicamente en *P. dilatatum* para la fecha del 22-1 fue mayor y significativo en el tratamiento 1 (T1 = plantas inoculadas con *A. strictum*) y el testigo (T3), respecto a T2 (tratado con fungicida). En *P. notatum* no hubo diferencias para estos tratamientos. Dado que los cariopses sanos pueden estar tan cubiertos de exudado como los enfermos (Burton, 1945), la presencia o ausencia de exudado (% de severidad) no es considerada un criterio completamente satisfactorio para determinar si las flores están infectadas o no.

La determinación del porcentaje de incidencia y semillas llenas, son técnicas más laboriosas que requieren bastante tiempo y en cuanto a la determinación del valor de incidencia visual no hubo diferencias significativas para los endofitos en ninguna de las especies estudiadas.

Los resultados más importantes de este capítulo refieren a que parece existir un efecto significativo de los dos endofitos evaluados (*T. amazonicum* y *A. strictum*) aumentado el llenado y el número de semillas sanas en ambas forrajeras estudiadas. Clay (1987) reportó un mayor porcentaje de semillas llenas en plantas de festuca infectadas con endofitos. El mecanismo de los efectos fúngicos observados en estos estudios no está claro, pero se supone que la aparición de hifas fúngicas en regiones meristemáticas facilitaría la regulación hormonal de la división y diferenciación celular. Los resultados encontrados en esta investigación están en concordancia con lo hallado por Clay (1987). Posiblemente, metabolitos bioactivos sintetizados por los endofitos evaluados hayan contribuido a mejorar la regulación de la primera etapa del llenado de granos caracterizada por la división celular y luego en el proceso de diferenciación, favoreciendo el crecimiento del grano e impactando finalmente en el rendimiento. Para confirmar esta hipótesis, serán necesarias investigaciones específicas para revelar si se produce tal acción hormonal.

Respecto al número de semillas sanas, para su correcta determinación se tuvo en cuenta la incidencia mediante el tratamiento con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), porque los cariopses sanos son separados de los oscuros e irregulares más fácilmente para su

recuento que en la evaluación directa visual (Burton, 1945). Este número, también fue mayor y significativo en las plantas inoculadas con endofitos a campo (*in vivo*) y es importante relacionarlo con nuestros resultados del potencial biocontrol de los endofitos *in vitro* (capítulo III). Estos últimos, son útiles y necesarios para la identificación de antagonistas candidatos a ser utilizados para el control biológico y permiten hacer conjeturas sobre los mecanismos por los cuales reducen los daños causados por patógenos. No necesariamente indican lo que ocurre *in planta*, ya que sólo se enfrentan dos microorganismos en condiciones controladas y, además, el hospedante se encuentra ausente. En nuestra investigación *in vitro*, se enfrentó a los antagonistas a *A. alternata*, *Bipolaris* sp. (patógenos causantes de enfermedades foliares) y al principal objeto de estudio *C. paspali*, agente causal de ergot en *Paspalum*. Frente a este último los resultados indicaron que existiría un efecto antagónico por micoparasitismo de la especie *A. strictum* frente al inóculo de *C. paspali*. Por otro lado, *T. amazonicum*, lograría inhibir en algún punto a *C. paspali* por su gran capacidad competitiva, pero la presencia de algún alcaloide del tipo ergot disminuiría la esporulación de este antagonista. Por ser un hongo biótrofo, el cual sólo puede vivir y multiplicarse en un hospedante vivo, los resultados del análisis bajo condiciones de laboratorio tienen sus limitaciones. Si bien algunos hongos endofíticos de *Paspalum* pueden tener potencial para mejorar la productividad de las plantas, era necesario explorar los efectos netos de las comunidades endofitas en condiciones de campo y frente a la principal enfermedad del hospedante. Por lo tanto, este hongo también fue evaluado a campo y dado que el desarrollo de una enfermedad depende del contexto, es decir, de las condiciones ambientales, del patógeno y del hospedante, los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio y a campo pueden ser diferentes. En nuestro análisis, los resultados *in vivo* parecen acompañar a lo obtenido *in vitro*, ya que las plantas E+ produjeron mayor contenido de semillas llenas sanas demostrando un efecto antagónico. Si bien los endofitos son en gran medida modificadores de la gravedad de la enfermedad en la planta huésped y el mecanismo aún no está claro (Busby *et al.*, 2015), posiblemente este efecto se deba al micoparasitismo de la especie *A. strictum* y a la gran capacidad competitiva de *T. amazonicum* (manifestados *in vitro*, capítulo III). Estos procesos podrían ser los responsables de inhibir a *C. paspali* permitiendo el mayor desarrollo de semillas sanas *in vivo*.

Lopes *et al.*, (2018) establecen que en las especies de *Paspalum*, una gran parte de los componentes vinculados al rendimiento de semillas están relacionados con el número de macollos reproductivos e inflorescencias. El análisis del efecto de los endofitos en el crecimiento vegetal, realizado bajo condiciones controladas en invernadero, arrojó como resultado que las plantas de *P. dilatatum* infectadas con *A. strictum* presentaron significativamente un mayor número de macollos, materia seca aérea y radicular que las

plantas libres. Las plantas de *P. notatum* infectadas con *T. amazonicum* lograron mayor contenido relativo de clorofila. Este efecto en el crecimiento, específicamente en el incremento de macollos productivos, junto a un mayor porcentaje de llenado y al efecto antagónico podrían resultar en un aumento en la producción de semillas sanas por unidad de superficie.

En *P. dilatatum*, un porcentaje de llenado de semillas de 30% es considerado bueno y de 50 a 60% excelente (Evers y Burson, 2016). En general, en nuestros experimentos los resultados arrojados fueron muy bajos (Figura 31). Analizando las posibles causas, existen reportes de qué condiciones climáticas desfavorables y la infección por ergot son los mayores problemas que producen disminuciones en el porcentaje de llenado (Evers y Burson, 2016). En nuestro caso, al ser una especie más adaptada a zonas templadas (USDA, 2013), que ha sido evaluada en una región cálida como Riachuelo, posiblemente se deba al hecho de estar fuera de su ambiente.

Varios estudios han demostrado que las aplicaciones de fungicidas en el momento adecuado pueden reducir el desarrollo en diferentes especies de gramíneas. Los fungicidas de la familia de los triazoles aplicados en antesis y luego a intervalos de 4 a 5 días controlaron eficazmente la enfermedad en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) causado por *Claviceps africana* Freder (Ryley *et al.*, 2003). Los mismos autores también informaron que la antesis fue la etapa de crecimiento más importante en relación con la infección. Además, los tratamientos con fungicidas redujeron significativamente el desarrollo de esclerocios bajo altos niveles de infección por *Claviceps purpurea* (Fr.) en *Poa pratensis* L., y dos aplicaciones de propiconazol produjeron los mejores resultados, mientras que dos aplicaciones de azoxistrobina o tebuconazol también controlaron exitosamente al patógeno. Así mismo, las aplicaciones de fungicidas redujeron significativamente la melaza en las cabezas de las semillas y ninguno de los fungicidas afectó el peso o la germinación de las semillas de estas gramíneas (Butler *et al.*, 1997).

En *Paspalum*, se recomienda realizar al menos dos aplicaciones de fungicida, la primera coincidiendo con la antesis y la segunda cuatro a seis días después (Butler *et al.*, 1997; Ryley *et al.*, 2003). Aunque, el ligero aumento en la eficiencia reproductiva después de la aplicación de fungicidas puede no ser económicamente justificable para la producción de semillas en *P. notatum*. Si bien la antesis fue reportada como la etapa crítica en relación con la infección y se ha demostrado que una sola aplicación de tebuconazol redujo la severidad de la enfermedad, ningún fungicida pudo reducir la incidencia de este patógeno (Rios *et al.*, 2015). De acuerdo a estos reportes, los resultados obtenidos en este estudio en

los tratamientos con fungicida tampoco lograron reducir significativamente la incidencia. El bajo efecto del agroquímico pudo deberse a que no fue desarrollado específicamente para el control de ergot y a que el cultivar Argentine y Sureño son bastante susceptibles a la enfermedad. A su vez, podrían haber sido necesarias más aplicaciones para obtener un mejor efecto sobre la misma.

En base a las evidencias descriptas en este capítulo, se logró alcanzar ambos objetivos específicos planteados inicialmente, obteniendo resultados que permiten aceptar la hipótesis 3: “El tratamiento de semillas con humedad y temperatura, permite obtener plantas E- (libres de endofito) y la posterior inoculación genera plantas E+ (infectadas) en *Paspalum*”.

Respecto a la hipótesis 4: “La interacción planta-hongo endofito genera beneficios en el crecimiento aumentando la altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea en gramíneas infectadas sobre las no infectadas y controla determinadas enfermedades en la planta”, fue aceptada parcialmente. El motivo es que los resultados de los análisis de potencial biocontrol de estos endofitos *in planta* limitaron el desarrollo de la enfermedad generando mayor número y peso de semillas llenas sanas, pero permitieron aumentar solo algunos de los parámetros agronómicos evaluados. *T. amazonicum* aumentó el contenido relativo de clorofila en *P. notatum* y *A. strictum* promovió el número de macollos y la biomasa (aérea y radical) en *P. dilatatum*.



## CONCLUSIONES

- El objetivo 3 planteado fue alcanzado exitosamente, pudiéndose obtener plantas E+ y E- tanto en *P. notatum* como en *P. dilatatum*.
- La hipótesis 3: “El tratamiento de semillas con humedad y temperatura, permite obtener plantas E- (libres de endofito) y la posterior inoculación genera plantas E+ (infectadas) en *Paspalum*”, fue aceptada.
- El objetivo 4 planteado fue alcanzado, pudiéndose medir parámetros agronómicos en plantas E+ y E-; y evaluar el control de enfermedades *in planta*.
- La hipótesis 4: “La interacción planta-hongo endofito genera beneficios en el crecimiento aumentando la altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea en gramíneas infectadas sobre las no infectadas y controla determinadas enfermedades en la planta”, fue aceptada parcialmente.
- Entre los efectos con importancia biológica y productiva, *T. amazonicum* aumentó el contenido relativo de clorofila en *P. notatum* en condiciones de invernadero.
- *A. strictum* promovió el número de macollos y la biomasa (aérea y radical) en *P. dilatatum* en condiciones de invernadero.
- Los resultados reportados aquí sugieren que los endofitos de *T. amazonicum* y *A. strictum* podrían usarse para aumentar el rendimiento de forraje en las pasturas de la especie.
- Parece existir un efecto significativo de los dos endofitos evaluados (*T. amazonicum* y *A. strictum*) aumentado el número y peso de semillas llenas sanas en ambas forrajeras estudiadas.
- El tratamiento con fungicida redujo, pero no logró evitar completamente el desarrollo de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

- Acuña, C. A., Martínez, E. J., Zilli, A. L., Brugnoli, E. A., Espinoza, F., Marcón, F., Quarín, C. L. (2019). Reproductive systems in *Paspalum*: Relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques, and adoption of released cultivars. *Frontiers in Plant Science*. (in press) <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01377>
- Anjos, J. R. N., Charchar, M. J. A., Teixeira, R. N., & Anjos, S. S. N. (2004). Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29(6), 656–658. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582004000600010>
- Alderman, S. C. 2003. Diversity and speciation in *Claviceps*. Pages 195-245 in: *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Alderman, S. C., Halse, R. R., and White, J. F. 2004. A reevaluation of the host range and geographical distribution of *Claviceps* species in the United States. *Plant Dis*. 88:63-81.
- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51-66.
- Bacon, C. W., & White, J. F. J. (2000). Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the *Clavicipitaceae*. In C. W. Bacon & J. F. J. White (Eds.), *Microbial endophytes* (pp. 237–263). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., Meredith, F., 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health Perspect.* 109, 325–332.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuels, G.J., Choi, I.-Y., Holmes, K.A., 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224, 1449–1464.
- Bonos SA, Wilson MM, Meyer WA, Funk CR. 2005. Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. *Applied Turfgrass Science* 10: 1094.
- Bonello P, Capretti P, Luchi N, Martini V, Michelozzi M (2008) Systemic effects of *Heterobasidion annosum* ss infection on severity of *Diplodia pinea* tip blight and terpenoid metabolism in Italian stone pine (*Pinus pinea*). *Tree Physiol* 28:1653–1660

- Brown, H. B. 1916. Life history and poisonous properties of *Claviceps paspali*. J. Agric. Res. 7:401-406.
- Burton, G. W. 1942. Observations of the flowering habits of four *Paspalum* species. Am. J. Bot. 29:179-187.
- Burton, G. W. (1945). A Technic for Measuring Ergot Resistance in *Paspalum* Species. Agronomy Journal, 37(2), 160. doi:10.2134/agronj1945.00021962003700020010x
- Burton, G. W. y Lefebvre, C. L. 1948. Ergot and sterility in bahiagrass. Phytopathology 38:556-559.
- Busby, P. E., Ridout, M., & Newcombe, G. (2015). Fungal endophytes: modifiers of plant disease. Plant Molecular Biology, 90(6), 645–655. doi:10.1007/s11103-015-0412-0
- Butler, M., Alderman, S. N., and Crowe, F. 1997. Evaluation of fungicides for control of ergot in Kentucky bluegrass. Pages 54-56 in: Central Oregon Agricultural Research Center Annual Report 987. COARC, Oregon State University, Corvallis, OR.
- Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology 69: 10-16.
- Clay K (1998). Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: Cheplick GP. (Eds.), Population Biology of Grasses, Cambridge University Press, Cambridge. 255-285. USA. 412pp
- Clarke BB, White JF, Hurley H, Torres MS, Sun S, Huff DR (2006) Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. Plant Dis 90:994–998
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Cook RJ, Baker KF (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society (APS Press), University of Michigan, Ann Arbor, p 539
- Depetris, M. B., Acuña, C. A., Gutierrez, S., Marcón, F., & Felitti, S. A. (2020). Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. Grass and Forage Science, 75:316–325. doi: doi.org/10.1111/gfs.12494

- Devedee, A. K., Rakshit, A., & Kumari, R. (2020). *Trichoderma improves photosynthetic features of rajmash (Phaseolus vulgaris C. V. HUR-137) in Varanasi region of Uttar Pradesh*. 9(1), 2127–2130
- Dingle, J., McGee, P.A., 2003. Some endophytic fungi reduce the density of *Puccinia recondita* fsp. *tritici* in wheat. *Mycol. Res.* 107, 310–316
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2018). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Retrieved from [http:// www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Evers, G. W., & Burson, B. L. (2016). Dallisgrass and other paspalum species. *Warm-Season (C4) Grasses*, 45, 681–713. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr45.c20>
- Feldman, T. S., O'Brien, H., and Arnold, A. E. 2008. Moth dispersal of mycoparasites and endophytes associated with *Claviceps paspali* and the grass *Paspalum* (Poaceae). *Microb. Ecol.* 56:742-750
- Gamboa, M. (2006). Hongos endofitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 3–20
- García Lemos, A., Gil-cardeza, M. L., Gómez, V., & Felitti, S. A. (2017). *Fungal Endophytes in Species of Paspalum and Bromus, Occurrence and In Vitro Antagonistic Activity Assessment*. 5(3), 15–25.
- Ghazanfar MU, Raza M, Raza W, Qamar MI (2018). TRICHODERMA AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENT, ITS EXPLOITATION IN AGRICULTURE: A REVIEW. *Plant Protection*, 02 (03) 109-135
- Gundel, P. E., Perez, L. I., Helander, M., & Saikkonen, K. (2013). Symbiotically modified organisms: Nontoxic fungal endophytes in grasses. *Trends in Plant Science*, 18, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.003>
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.* 1997; 43:895-914.
- Hamayun, M., Hussain, A., Shah, M., & Waqas, M. (2018). *Endophytic fungi promote growth of Zea mays L. under PEG induced drought stress*. *m J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 8(3)95-101
- Harman, G. E., Doni, F., Khadka, R. B., & Uphoff, N. (2019). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of Applied Microbiology*,

2005, 1–18. <https://doi.org/10.1111/jam.14368>

Hill, N. S., Stringer, W. C., Rottinghaus, G. E., Belesky, D. P., Parrott, W. A., Pope, D. D. (1990). *Growth, Morphological, and Chemical Component Responses of Tall Fescue to Acremonium coenophialum*. *Crop Sci.* 30:156-1

Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog* 4:e1000061

Ikeda, A., Matsuoka, S., Masuya, H., Mori, A. S., Hirose, D., & Osono, T. (2014). Comparison of the diversity, composition, and host recurrence of xylariaceous endophytes in subtropical, cool temperate, and subboreal regions in Japan. *Population Ecology*, 56(2), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s10144-013-0412-3>

Istifadah, N., Saleeba, J., McGee, P., 2006. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro. *Can. J. Bot.* 84, 1148–1155

Kandula DRW, Jones EE, Stewart A, McLean KL, Hampton JG (2015) *Trichoderma* species for biocontrol of soil-borne plant pathogens of pasture species. *Biocontrol Sci Technol.* doi:10. 1080/09583157.2015.1028892

Kelemu, S., White, J. F. Jr, Muñoz, F., & Takayama, Y. (2001). An endophyte of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*: Isolating, identifying, and characterizing the fungus, and determining its antimycotic properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 55–62. <https://doi.org/10.1139/w00-127>

Khan, H. I. (2018). Appraisal of biofertilizers in rice: To supplement the inorganic chemical fertilizer. *Rice Science*, 25, 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.10.006>

Kleczewski, N. M., Bauer, J. T., Bever, J. D., Clay, K., & Reynolds, H. L. (2012). A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal Ecology*, 5(5), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.006>

Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., ... Kramer, D. M. (2016). MultispeQBeta: A tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQnetwork. *Royal Society Open Science*, 3, 160592. <https://doi.org/10.1098/rsos.160592>

Lahlali R and Hijri M, 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology*

Letters, 311, 152–159.

Larran, S., Simón, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. P. S., & Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, 92, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002>

Latch, G. C. M., Hunt, W. F., & Musgrave, D. R. (1985). Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 28(1), 165–168. <https://doi.org/10.1080/00288233.1985.10427011>

Leonor Carrillo. (1995). Los Hongos De Los Alimentos Y Forrajes: Aspergillus. *Official Methods of Analysis*, 49.

Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, van der Lelie D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci*. 2002; 21:583-606.

Evers, G. W., & Burson, B. L. (2016). Dallisgrass and other paspalum species. *Warm-Season (C4) Grasses*, 45, 681–713. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr45.c20>

López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>

Matsuoka H, Akiyama M, Kobayashi K, Yamaji K. Fe and P solubilization under limiting conditions by bacteria isolated from Carex kobomugi Roots at the Hasaki Coast. *Curr Microbiol*. 2013; 66(3):314-21.

Mejía, L.C., Rojas, E.I., Maynarda, Z., Van Bael, S., Arnold, A.E., Hebbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., Herre, E.A., 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of Theobroma cacao pathogens. *Biocontrol* 46, 4–14.

Nandhini, M., Rajini, S. B., Udayashankar, A. C., Niranjana, S. R., Lund, O. S., Shetty, H. S., & Prakash, H. S. (2018). Diversity, plant growth promoting and downy mildew disease suppression potential of cultivable endophytic fungal communities associated with pearl millet. *Biological Control*, 127, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.019>

Palacio A, C. M. (2009). Infecciones por hongos invasores en imágenes. In *Infecciones por hongos invasores en imágenes*.

Patle, P., Phule Krishi Vidyapeeth, M., Navnage, I. N., Krishi Vishwavidyalaya, G.,

- Ramteke, I. P., Navnage, N., & Ramteke, P. (2018). Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. *270 ~ International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 270–274.
- Porras-Alfaro, A., Bayman, P., 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 291–315.
- Pruss Gail et al (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9(6):859–868
- Rios E, Blount A, Harmon P, Mackowiak C, Kenworthy K, Quesenberry K (2015). Ergot Resistant Tetraploid Bahiagrass and Fungicide Effects on Seed Yield and Quality. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-RS-14-0051
- Rajini, S. B., Nandhini, M., Udayashankar, A. C., Niranjana, S. R., Lund, O. S., & Prakash, H. S. (2020). Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*. *Plant Pathology*, 0–1. <https://doi.org/10.1111/ppa.13151>
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Ryley, M., Bhuiyan, S., Herde, D., and Gordan, B. 2003. Efficacy, timing and method of application of fungicides for management of sorghum ergot caused by *Claviceps africana*. *Australas. Plant Pathol.* 32:329-338
- Saikkonen, K., Faeth, S., Helander, M., & Sullivan, T. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 29, 319–343. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319>
- Sánchez Marquez, S., Bills, G. F., García Criado, B., & Zabalgoceazcoa, I. (2004). *Hongos asociados a gramíneas silvestres de pastos naturales*. *Pastos y Ganadería Extensiva*: 163-166
- Taechowisan T, Chunhua LU, Shen Y, Lumyong S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity; *Microbiology*. 2005; 151:1691-1695.
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B and Wang Y, 2011. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 464–470.



Vargas, W.A., Mandawe, J.C. and Kenerley, C.M. (2009) Plant- derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol* 151, 792–808.

Villar, A. D. 1984. Pasto miel: aportes para su introducción en nuestras praderas consociadas. *Acintacnia* 5:34-35.

Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang SM, Kim YH et al., 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17, 10754–10773.

Yuan Y, Feng H, Wang L, Li Z, Shi Y, Zhao L et al., 2017. Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease. *PLoS ONE*, 12, e0170557.

Yokoya K, Postel S, Fang R and Sarasan V, 2017. Endophytic fungal diversity of *Fragaria vesca*, a crop wild relative of strawberry, along environmental gradients within a small geographical area. *PeerJ*, 5, e2860.

Yue C, Miller CJ, White JFJ, Richardson M. 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 48: 4687-4692

Zabalgogezcoa, I., Gundel, P. E., Helander, M., & Saikkonen, K. (2013). Non-systemic fungal endophytes in *Festuca rubra* plants infected by *Epichloë festucae* in subarctic habitats. *Fungal Diversity*, 60, 25–32. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0233-x>

## **CAPITULO V: COMENTARIOS FINALES**

## CONCLUSIONES ABORDADAS

Debido a la importancia y utilidad del género *Paspalum* en los ambientes nativos, el cultivo de varias especies a nivel internacional y dado que los endofitos forman con sus hospedantes relaciones simbióticas, establecimos posibles efectos de los hongos endofitos en el control biológico de patógenos y en el crecimiento vegetal. A continuación, se detalla el contraste de las hipótesis planteadas:

**Hipótesis 1: “Existen asociaciones simbióticas de distintas especies de hongos endofitos con especies forrajeras del género *Paspalum*”.**

En el capítulo II de esta tesis se comprobó que existe una gran diversidad de endofitos fúngicos en *P. notatum* y *P. dilatatum* por lo cual ha sido aceptada. Los resultados concuerdan con lo encontrado por otros autores donde en el género *Paspalum* hallaron diversos hongos endofitos a nivel foliar, que actúan como simbioses (Sánchez Márquez *et al.*, 2008; García Lemos *et al.*, 2017).

El objetivo específico 1, “Aislar e identificar taxonómicamente hongos endofitos en *P. notatum* y *P. dilatatum* por medio de técnicas convencionales de aislamiento, cultivo de hongos filamentosos e identificación morfológica y molecular” fue alcanzado exitosamente. Se han logrado identificar hasta 10 géneros fúngicos conocidos como *No Clavicipitaceos* clase 3. Corresponden a los endofitos fúngicos más comunes restringidos a los tejidos aéreos, forman infecciones locales y se transmiten horizontalmente. A su vez, el género *Trichoderma sp.* no se ha informado previamente como endofito aéreo en estas gramíneas de *Paspalum* en Argentina.

**Hipótesis 2: “Los hongos endofitos, actúan como agentes de control biológico contra diversos patógenos fúngicos causantes de enfermedades en especies forrajeras del género *Paspalum*”.**

El capítulo III ha demostrado que existe un efecto antagónico de los endofitos evaluados contra hongos fitopatógenos de *Paspalum* mediante pruebas *in vitro*. Estos resultados permitieron aceptar la hipótesis y alcanzar el objetivo 2, “Evaluación de la capacidad de los endofitos como controladores de enfermedades de *Paspalum*, probando su efecto antagónico contra fitopatógenos mediante pruebas *in vitro*”. La especie *Trichoderma amazonicum* fue hallada en *Paspalum notatum* y presentó alto potencial para el control biológico *in vitro* de los patógenos fúngicos de gramíneas, *Alternaria alternata* y *Bipolaris sp.* Esta tesis permitió determinar los posibles mecanismos de biocontrol ejercidos, los cuales serían micoparasitismo y competencia por recursos. A su vez, la técnica de excavación placa cultivo indicó que lograría inhibir a *C. paspali* por su gran capacidad

competitiva, pero la presencia de algún alcaloide del tipo ergot disminuiría la esporulación de este antagonista. Por otro lado, *Acremonium strictum* ha sido aislado de *Paspalum dilatatum* y demostró moderado a bajo potencial *in vitro* como controlador de *Alternaria alternata* y *Bipolaris sp* respectivamente. Los mecanismos más importantes de biocontrol ejercidos por *Acremonium strictum*, parecerían ser la producción y liberación de metabolitos secundarios y la competencia por recursos. Existiría un efecto antagónico por micoparasitismo de la especie *Acremonium strictum* frente al inóculo de *C. paspali*. Ambos antagonistas han indicado que su potencial biocontrolador por metabolitos volátiles es bastante bajo.

**Hipótesis 3: “El tratamiento de semillas con humedad y temperatura, permite obtener plantas E- (libres de endofito) y la posterior inoculación genera plantas E+ (infectadas) en *Paspalum*”.**

En la primera parte del capítulo IV se ha llevado a cabo una técnica para cumplir el objetivo 3 planteado: “Puesta a punto de un protocolo a fin de obtener plantas isogénicas de *Paspalum* E- (libres de endofito) y E+ (infectadas) para estudios comparativos posteriores”. Como resultado de esta metodología se consiguieron plantas E+ y E- tanto en *P. notatum* como en *P. dilatatum*, por lo cual la hipótesis fue aceptada. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Kleczewski *et al.*, (2012). Las plantas resultantes permitieron realizar los análisis del efecto de estos endofitos sobre el comportamiento agronómico en condiciones controladas de invernadero.

**Hipótesis 4: “La interacción planta-hongo endofito genera beneficios en el crecimiento aumentando la altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea en gramíneas infectadas sobre las no infectadas y controla determinadas enfermedades en la planta”.**

En la segunda parte correspondiente al capítulo IV, se llevó a cabo la evaluación de los endofitos (que mostraron potencial antagonista frente a fitopatógenos *in vitro*, capítulo III) sobre diferentes parámetros del crecimiento vegetal en un estudio en invernadero. Los resultados hallados fueron que *T. amazonicum* aumentó el contenido relativo de clorofila en *P. notatum* y *A. strictum* promovió el número de macollos y la biomasa (aérea y radical) en *P. dilatatum*.

Finalmente, estos endofitos también fueron evaluados en un ensayo a campo (*in vivo*), frente al fitopatógeno *Claviceps paspali* a fin de consolidar los resultados *in vitro* (capítulo III). En concordancia, se vio un efecto significativo de los dos endofitos evaluados (*T. amazonicum* y *A. strictum*) aumentado el llenado y la producción de semillas sanas en

ambas forrajeras estudiadas. De esta manera, el objetivo 4, “Medición de parámetros agronómicos en plantas infectadas y no infectadas con el hongo endofito, tales como: altura de planta, nº de macollos, nº de hojas/macollo, longitud de hojas, ancho de hojas, peso seco de la parte aérea; cobertura, características nutritivas y evaluación de control de enfermedades *in planta* como consecuencia de la presencia del hongo endofito” fue alcanzado y la hipótesis aceptada parcialmente. La razón es que los resultados de los análisis de potencial biocontrol de estos endofitos *in planta* mostraron mayor número de semillas llenas sanas y peso de semillas en presencia de *C. paspali*, pero permitieron aumentar solo algunos de los parámetros agronómicos evaluados en invernadero.

## APLICACIONES POTENCIALES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Las tecnologías aplicadas a las diferentes áreas de la agricultura y ganadería han mejorado la producción, pero varias de las prácticas realizadas afectan considerablemente el medio ambiente. El desafío reciente que enfrentan los sistemas productivos es lograr mayores rendimientos de una manera sustentable (Ghazanfar *et al.*, 2018).

La capacidad de los endofitos de colonizar los tejidos internos del huésped, los ha hecho valiosos como una potencial herramienta para mejorar el rendimiento de los cultivos y una mayor resistencia a diversos ataques de fitopatógenos (Clay *et al.*, 1998; Bacon y White, 2000; Gundel *et al.*, 2013; Lacava y Azevedo, 2014; Patle *et al.*, 2018). El principal interés es que producen metabolitos secundarios activos que son utilizados por la planta principalmente para su propósito de supervivencia contra el estrés abiótico y biótico. Esto ha instaurado mucha atención en la investigación académica e industrial, ya que una cuestión importante para mejorar la sustentabilidad de los sistemas productivos es que los metabolitos de los endofitos se consideran seguros porque muestran baja toxicidad para los humanos y animales (Rajini *et al.*, 2020).

Los métodos empleados en este estudio proporcionaron información relevante acerca de la composición de la comunidad de hongos endofíticos que colonizan a *P. notatum* y *P. dilatatum*. Comprender la diversidad de hongos endofíticos en una planta huésped es clave para identificar los nuevos compuestos antimicrobianos específicos sintetizados. A su vez, los resultados reportados sugieren que *T. amazonicum* y *A. strictum* podrían usarse para aumentar el llenado y la producción de semillas sanas frente al fitopatógeno *C. paspali*, y por otro lado, el rendimiento del forraje en ambas especies estudiadas.

Una aplicación potencial de los resultados de los estudios en invernadero, podría ser la **formulación de bioestimulantes** en base a estos microorganismos, considerados seguros, eficientes y amigables con el medio ambiente. López-Bucio *et al.*, (2015),

establecen que los productos a base de *Trichoderma* han sido particularmente exitosos en horticultura por su acción bioestimulante y por su capacidad para controlar hongos fitopatógenos.

Durante el desarrollo de los ciclos productivos se utilizan una gran cantidad de fungicidas químicos sintéticos para el manejo de enfermedades fúngicas. Su uso reiterado conduce al desarrollo de cepas patógenas resistentes, serios problemas de salud y a un mayor impacto ambiental (Rajini *et al.*, 2020). Otra aplicación potencial de los resultados (análisis *in vitro* e *in vivo*), podría ser la **síntesis de fungicidas biológicos** que inhiben/antagonizan a microorganismos patógenos. En nuestro caso, fueron evaluados frente a la enfermedad causada por *Claviceps paspali*, la cual reduce la calidad de la semilla, el rendimiento y aumenta los costos de implantación (Burton, 1955; Blount y Acuña 2009). La utilización de biofungicidas podría ser una alternativa ecológica para ayudar a reducir o eliminar el uso de productos químicos en el control de esta enfermedad.

Los sistemas de pastizales infectados con endofitos deben ser reconocidos en los planes de producción animal y en las prácticas agrícolas, dadas las consecuencias sobre la sostenibilidad de los forrajes y su productividad (Saikkonen *et al.*, 2013).

## INVESTIGACIÓN FUTURA

Una alta proporción de hongos endofitos producen componentes biológicamente activos con propiedades bioestimulantes, herbicidas, antibacteriales y fungicidas, de esta forma, proporcionan características favorables para el control biológico, crecimiento, mantenimiento y adaptación de las plantas (Tan y Zou, 2001). A su vez, son una fuente importante de nuevos productos farmacéuticos, ofreciendo un enorme potencial para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos y químicamente novedosos con un enorme potencial medicinal y agrícola (Schulz *et al.*, 2002). Es evidente que se requieren más investigaciones para **determinar metabolitos bioactivos** que permitan una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en el efecto antagónico, en el crecimiento vegetal, en la regulación hormonal de la división y diferenciación celular durante el llenado de granos y de esta manera, en la interacción huésped-endofito.

Los hongos endofitos de pastos de ciclo invernal producen metabolitos específicos como peramina y lolina, los cuales proveen protección contra plagas de insectos y nematodos. Por otro lado, algunos pastos como *Lolium arundinaceum* y *Lolium perenne* poseen hongos endofitos que acumulan alcaloides como lolitremono B y ergovalina que resultan tóxicos para el ganado (Schulz *et al.*, 2002). Los efectos de estos alcaloides

incluyen toxicosis, necrosis, baja producción de leche, abortos, vasoconstricción, pérdida de peso, temperatura alta y supresión de prolactina (Gamboa, 2006). Por otro lado, serán necesarios más **experimentos en condiciones de campo y en presencia de ganado** a fin de determinar que el efecto en el crecimiento encontrado en condiciones de invernadero se mantenga a campo y sea un beneficio que no vaya en detrimento del pastoreo animal, el cual es uno de los destinos finales de la producción de estos pastos. A su vez, sería importante evaluar la producción de semillas por unidad de superficie, que no ha sido evaluado hasta el momento.



## BIBLIOGRAFIA

Bacon CW, White J FJ (2000). Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In CW Bacon & JFJ White (Eds.), Boca Raton, FL: CRC Press. Microbial endophytes, 237-263

Blount, A. R., and Acuña, C. A. 2009. Bahiagrass. Pages 81-110 in: Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series: Forage crops, vol. 5. R. J. Singh, ed. CRC, Boca Raton, FL.

Burton, GW (1955). Breeding Pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. method of reproduction. *Agronomy Journal*, 47: 311 – 314

Clay K (1998). Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: Cheplick GP. (Eds.), *Population Biology of Grasses*, Cambridge University Press, Cambridge. 255-285. USA. 412pp

Gamboa, M. (2006). Hongos endofitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 3–20

García Lemos, A., Gil-cardeza, M. L., Gómez, V., & Felitti, S. A. (2017). *Fungal Endophytes in Species of Paspalum and Bromus, Occurrence and In Vitro Antagonistic Activity Assessment*. 5(3), 15–25.

Ghazanfar MU, Raza M, Raza W, Qamar MI (2018). TRICHODERMA AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENT, ITS EXPLOITATION IN AGRICULTURE: A REVIEW. *Plant Protection*, 02 (03) 109-135

Gundel, P. E., Perez, L. I., Helander, M., & Saikkonen, K. (2013). Symbiotically modified organisms: Nontoxic fungal endophytes in grasses. *Trends in Plant Science*, 18, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.003>

Kleczewski, N. M., Bauer, J. T., Bever, J. D., Clay, K., & Reynolds, H. L. (2012). A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal Ecology*, 5(5), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.006>

Lacava PT, Azevedo JL (2014). Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. V.C. Verma and A.C. Gange (eds.), *Advances in Endophytic Research*. Springer India, 231-256

López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>

Patle, P., Phule Krishi Vidyapeeth, M., Navnage, I. N., Krishi Vishwavidyalaya, G., Ramteke, I. P., Navnage, N., & Ramteke, P. (2018). Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. 270 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 270–274.

Rajini, S. B., Nandhini, M., Udayashankar, A. C., Niranjana, S. R., Lund, O. S., & Prakash, H. S. (2020). Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of Sorghum bicolor. *Plant Pathology*, 0–1. <https://doi.org/10.1111/ppa.13151>

Saikkonen K, Ruokolainen K, Huitu O, Gundel PE, Piltti T, Hamilton CE, Marjo Helander M (2013). Fungal endophytes help prevent weed invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1651-1655.

Sánchez Márquez S, Bills GF, Zabalgoceazcoa I (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, 33:87-100

Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K (2002). Review: Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106: 996-1004.

Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). *Endophytes: a rich source of functional metabolites (1987 to 2000)*. *Natural Product Reports*, 18(4), 448–459. doi:10.1039/b100918o