



IBONE  
CONICET  
UNNE



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**

Facultad de Ciencias Agrarias

**Caracterización de microorganismos contaminantes en  
sistemas de micropropagación de yerba mate (*Ilex  
paraguariensis*)**

Tesis presentada para optar por el grado Académico de Doctor de la  
Universidad Nacional del Nordeste en el Área de Recursos Naturales

**Ing. Agr. MARÍA LAURA PÉREZ**

Director: Ing. Agr. Luis A. MROGINSKI

Co-directora: Dra. Ernestina GALDEANO

Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE)

Instituto de Botánica Del Nordeste (UNNE-CONICET)

Corrientes-Argentina

2016

**A mí querida familia...**

**A mi hijo Juan Ignacio y a mi mamá Claris**

## **RECONOCIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Agrarias por brindarme siempre lugar en su casa y por haberme permitido realizar mis estudios doctorales.

Al Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET) especialmente al laboratorio de Fisiología Vegetal por brindarme las instalaciones y el instrumental para realizar la tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y a la Secretaría General de Ciencia y Técnica por permitirme realizar el doctorado con el otorgamiento de sus becas y subsidio.

A las autoridades y personal de posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, por acompañarme en el transcurso de la tesis brindándome siempre soluciones.

Al Doctorado de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste en el Área de Recursos Naturales por haberme permitido desarrollar la tesis en su programa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dicen que si algo no te mata, te hace más fuerte, doy fe de ello. Me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos a todas y cada una de las personas que han contribuido a que esta tesis sea una realidad.

A mi director, el Ing. Agr. Luis Mroginski por brindarme su apoyo, ideas y conocimiento para el desarrollo de la tesis. Por guiarme y aconsejarme en mi vida profesional.

A mi codirectora, la Dra. Ernestina Galdeano, por brindarme la posibilidad de desarrollar este trabajo, por aportar al tema, en la estructura de la tesis y por sus correcciones.

A la Ing. Agr. (MSc.) Dora Barreto un agradecimiento eterno al cielo, por brindarme sus conocimientos en el mundo de los hongos, ayudarme con las correcciones en cada detalle de la redacción de la tesis, por darme siempre sus sabios consejos, acompañarme incondicionalmente desde mi tesis de grado, y por sobre todo por su constante ánimo para que nunca “baje los brazos”.

Al director del IMyZA (INTA Castelar), Dr. Roberto Lecuona por permitirme hacer parte de mis trabajos allí. Al Dr. Ricardo Comerio por su gran colaboración en la identificación de hongos, también a Juan Carlos por su colaboración en el preparado de medios y cultivos.

A María Rosa, que junto a Dora me brindaron su ayuda en la redacción de la tesis, corrigiéndome cada detalle.

A la Dra. Mónica Collavino, por haberme enseñado muchas de las técnicas moleculares usadas en mi tesis con didáctica y paciencia, y por explicarme el mundo de la microbiología de forma sencilla y práctica.

A la Dra. Marta Zanelli por brindarme sus conocimientos en el complejo mundo de la estadística, por ayudarme en cada paso estadístico de la tesis, por abrirme las puertas de su casa en mis viajes a Bs. As. y por su cariño.

Al Dr. Pedro Sansberro, por ayudarme con los muestreos a campo y disponer siempre de las muestras de plantas de yerba mate que me permitieron realizar los ensayos de la tesis.

A la Ing. Agr. (MSc) Nani Castillo por su constante apoyo en la realización y culminación de la tesis, por su comprensión, aliento y sobre todo por su amistad.



A la Ing. Agr. María Agueda Cúndom por haberme brindado, las veces que necesité, material para poder realizar los ensayos de hongos de mi tesis.

A todas las personas que conforman al laboratorio Fisiología Vegetal del IBONE-FCA que de una u otra forma aportaron y me acompañaron en la tesis (en especial a Laura y Francisca, Ricardo Medina, Natalia Dolce, Mirta Faloci, Eduardo Flashland, Graciela Terada, Maura, Yael y Marina).

A mi jefe, el Dr. Guillermo Seijo por escucharme, aconsejarme, darme ánimos, alentarme a culminar la tesis y darme los tiempos y espacios necesarios para lograrlo.

A mis compañeros/as y amigas/os de trabajo del laboratorio de Citogenética y Evolución del IBONE-FCA (Laura, Lili, Betiana, Sara, Gabriela, Celeste, Alejandra, Evelin, Gisela, Germán, Esteban y Jonatan), especialmente a quienes me escucharon y acompañaron dándome siempre ánimos.

A mis colegas y amigas/os Fabiana Espasandín, Laura Fontana, Laura Vidoz, Patricia Angeloni, Francesco Mignolli, Maximiliano Acevedo, Edgardo Avico, Federico De Pedro y Pablo Klusasek, quienes me acompañaron, compartieron momentos de recreos y risas en el laboratorio siendo muy importantes en este período.

A mi amigo, el Lic. Leandro Cossio por su ayuda en el diseño del “envoltorio” de la tesis.

A mi familia, mi mamá Claris, mi hijo Juan Ignacio, mis hermanos Silvana y Diego, y mi sobrino Franco, quienes fueron el pilar más fuerte e importante en este desafío, quienes me acompañaron día a día y estuvieron presentes incondicionalmente. A mi hijo gracias por haber comprendido mis ausencias y haber logrado sacarme sonrisas en los momentos más tensos.

## **PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS**

**Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in *Ilex paraguariensis* grown under field conditions.** Pérez ML, Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Galdeano E. World J Microbiol Biotechnol (2016) 32:61.



## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
RESUMEN	1
SUMMARY	3
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1. YERBAMATE	5
1.1. Cultivo de yerba mate	5
1.2. Micropropagación de yerba mate	6
2. MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	8
2.1. Microorganismos endofíticos en cultivo <i>in vitro</i>	12
2.2. Microorganismos endofíticos en yerba mate	13
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVO GENERAL	13
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	15
1.1. Cultivo de Segmentos nodales	15
1.2. Cultivo de embriones	16
2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	17
2.1. Segmentos nodales cultivados <i>in vitro</i>	17
2.2. Plantas en condiciones de invernáculo	17
2.3. Plantas en condiciones de campo	17
2.4. Técnicas de aislamiento	18
3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	19



3.1. Hongos	19
3.2. Bacterias	20
4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	20
4.1. Extracción de ADN fúngico	20
4.2. Extracción de ADN bacteriano	21
4.3. Caracterización de cepas fúngicas	21
4.3.1. Caracterización de cepas del género <i>Fusarium</i>	23
4.4. Caracterización de cepas bacterianas	24
4.4.1. Caracterización de la diversidad de aislamientos bacterianos	24
4.4.2. Caracterización de aislamientos bacterianos	26
4.5. Purificación de los productos de PCR	27
4.6. Secuenciación de los productos de PCR purificados	27
4.7. Análisis de secuencias	28
5. ANÁLISIS DE FRECUENCIA Y DIVERSIDAD	28
6. PRUEBA DE PATOGENICIDAD	29
6.1. Preparación del inóculo e inoculación	29
6.2. Detección del inóculo	30
6.3. Reaislamiento del inóculo	30

### CAPÍTULO III: RESULTADOS. CONTAMINANTES DEL CULTIVO *IN VITRO* DE YERBA MATE. HONGOS Y BACTERIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS EN INVERNADERO

1. Caracterización morfológica de hongos	31
2. Caracterización molecular de hongos y análisis filogenético	32
3. Caracterización molecular de bacterias y análisis filogenético	34
4. Contaminantes en cultivo <i>in vitro</i>	37
5. Población endofítica de plantas en condiciones de invernadero	39



6. Microorganismos contaminantes en el cultivo <i>in vitro</i> y endofíticos de plantas en condiciones de invernadero de yerba mate	40
---	----

#### CAPÍTULO IV: RESULTADOS. HONGOS Y BACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE PLANTAS DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)

1. Caracterización de aislamientos	41
1.1. Identificación morfológica de hongos	42
1.2. Caracterización molecular de hongos y análisis filogenético	44
1.3. Característica Cultural de bacterias	50
1.4. Caracterización molecular de bacterias y análisis filogenético	50
2. Comunidad endofítica de plantas de yerba mate bajo condiciones de campo	61
2.1. Número de Aislamientos	61
2.2. Frecuencia y Diversidad	63
3. Ensayo de patogenicidad	73

#### CAPÍTULO V: DISCUSION Y CONCLUSIONES

Discusión	76
Conclusiones	83
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	85
<b>ANEXO</b>	105
Trabajos Publicados	107
Cursos de posgrado	108
Publicación	



## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
1. Hongos caracterizados en plantas de invernadero y de cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodales de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) con la accesión más cercana basadas en el análisis de BLAST (Genbank).....	33
2. Bacterias caracterizadas en plantas de invernadero y de cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodales de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) con la accesión más cercana basadas en el análisis de BLAST (Genbank).....	35
3. Porcentaje de tubos contaminados con hongos y bacterias en cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodales de yerba mate.....	38
4. Especies de <i>Fusarium</i> endofíticas aisladas de plantas de yerba mate y sus similitudes con accesiones extraías de Genbank.....	48
5. Número de aislamientos (Ai) de hongos en hojas (H) y tallos (T) y en órganos jóvenes (OJ) y adultos (OA) de plantas de yerba mate en seis muestreos.....	63
6. Número de aislamientos (Ai) de bacterias en hojas (H) y tallos (T) y en órganos jóvenes (OJ) y adultos (OA) de plantas de yerba mate en seis muestreos.....	63
7. Género de hongos endofíticos aislados de yerba mate según fecha de muestreo.....	64
8. Género de bacterias endofíticos aislados de yerba mate según fecha de muestreo.....	64
9. Número de aislamientos y frecuencia de colonización (%CF) de hongos endofíticos en hojas tallos en yerba mate.....	65
10. Número de aislamientos y proporción de especies de <i>Fusarium</i> para cada mes de muestreo.....	66



---

<b>11. Número de aislamientos y de Frecuencia de colonización (% CF) de bacterias endofíticas en hojas y tallos de yerba mate.....</b>	<b>67</b>
<b>12. Número de aislamientos de <i>Fusarium</i> en tipo de órgano (hoja y tallo) y edad (joven y adulto) del mismo en plantas de yerba mate.....</b>	<b>68</b>
<b>13. Órganos y edades de tejidos en los que aparecen especies de <i>Fusarium</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>14. Índices de Shannon y Simpson de hongos y bacterias endofíticos de yerba mate en 6 fechas de muestreo.....</b>	<b>71</b>
<b>15. Índices de Shannon y Simpson de hongos y bacterias endofíticos según clon aislados de plantas de yerba mate.....</b>	<b>72</b>
<b>16. Índices de Shannon y Simpson de hongos y bacterias endofíticos según órgano y edad aislados de plantas de yerba mate.....</b>	<b>73</b>
<b>17. Presencia (X) y ausencia de géneros de hongos y bacterias endofíticos aislados de plantas de yerba mate crecidas en el campo, en invernadero y/o en cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>84</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
1. Escala de severidad adaptada de La Mondia y Taylor (1987). Plántulas de yerba mate <i>in vitro</i> de cada nivel de la escala.....	29
2. Árbol filogenético de secuencias ITS de aislamientos de hongos aislados de cultivo <i>in vitro</i> y hongos endofíticos de plantas crecidas en invernadero y especies de referencia provenientes del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	33
3. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S ARNr de aislamientos de bacterias aisladas de cultivo <i>in vitro</i> y hongos endofíticos de plantas crecidas en invernadero y especies de referencia provenientes del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	36
4. Contaminación de hongos (a, b, c, d) bacterias (e, f) en cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodales de yerba mate.....	37
5. Número de aislamientos promedio de hongos y bacterias contaminantes del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodales de yerba mate.....	38
6. Número de aislamientos promedio de hongos y bacterias endofíticos de dos clones (67 y SI49) de plantas de yerba mate en condiciones de invernadero.....	39
7. Hongos (letra violeta) y bacterias (letra verde) aislados de cultivo <i>in vitro</i> y de plantas de invernadero o de ambos en yerba mate.....	40
8. Cultivos en APG de géneros de hongos endofíticos aislados de yerba mate caracterizados morfológicamente.....	44
9. Algunos géneros endofíticos aislados de yerba mate.....	44
10. Árbol filogenético mostrando la relación de las secuencias parciales representativas de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de aislamientos de hongos endofíticos de yerba mate y	





---

aislamientos de referencia provenientes del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap).....	46
<b>11.</b> Árbol filogenético basado en secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de hongos endofíticos (registradas en Genbank) construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	47
<b>12.</b> Árbol filogenético mostrando la relación de las secuencias representativas del EF- $\alpha$ 1 de aislamientos de <i>Fusarium</i> endofíticos de yerba mate y secuencias de aislamientos disponibles en el Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	48
<b>13.</b> Dendrograma que muestra la relación entre los aislamientos de bacterias endofíticas representativas de yerba mate basado en REP-PCR y análisis de UPGMA generado por el software GelCompar.....	52
<b>14.</b> Árbol filogenético del género <i>Curtobacterium</i> basado en el análisis de secuencias parciales del gen 16S del ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	53
<b>15.</b> Árbol filogenético del género <i>Microbacterium</i> basado en el análisis de secuencias parciales del gen 16S del ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	54
<b>16.</b> Árbol filogenético de la clase Actinobacteria basado en el análisis de secuencias parciales del gen 16S del ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	56
<b>17.</b> Árbol filogenético de la clase Proteobacteria basado en el análisis de secuencias parciales del gen 16S del ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	58



<b>18.</b> Árbol filogenético de la clase Beta y Gama basado en el análisis de secuencias parciales del gen 16S del ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	59
<b>19.</b> Árbol filogenético de la clase Firmicute basado en el análisis de secuencias parciales del gen 16S del ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).....	60
<b>20.</b> Número de aislamientos de hongos y bacterias endofíticos promedio de 3 plantas por fecha de muestreo de plantas de yerba mate.....	61
<b>21.</b> Número de aislamientos de hongos y bacterias endofíticos promedio de 3 plantas por clon yerba mate.....	62
<b>22.</b> Hongos endofíticos aislados de hojas o tallos de plantas de yerba mate.....	68
<b>23.</b> Bacterias endofíticas aisladas de hojas o tallos de plantas de yerba mate.....	70
<b>24.</b> Curva de rarefacción de hongos (a) y bacterias (b) endofíticos según fechas de muestreos de plantas de yerba mate.....	71
<b>25.</b> Curva de rarefacción de hongos (a) y bacterias (b) endofíticos según clones de plantas de yerba mate.....	72
<b>26.</b> Curva de rarefacción de hongos (a) y bacterias (b) endofíticos según órgano y edad de tejido aislados de yerba mate.....	73
<b>27.</b> Grado de severidad en plántulas de yerba mate inoculadas con <i>Fusarium pseudocircinatum</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>F. subglutinans</i> .....	74



---

**28.** Síntomas observados a los 14 y 49 días después de la inoculación por cada especie de *Fusarium*.....74

**29.** Microscopía electrónica de barrido. *Fusarium subglutinans*: a, d, g (cortes de hojas, tallo y raíz respectivamente) *F. pseudocircinatum*: b, e, h (cortes de hojas, tallo y raíz respectivamente) *F. oxysporum*: c, f, i (cortes de hojas, tallo y raíz respectivamente).....75



## ABREVIATURAS

$\lambda$ <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III RI y	marcador de peso molecular, ADN del fago lambda cortado con Eco Hind III
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ M	micromolar
$\mu$ mol	micromol
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosomal
AIA	ácido indolacético
ANA	ácido naftalenacético
APG	agar papa glucosado
ARN	ácido ribonucleico



---

ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucléico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
CMA	corneal meal agar
CF	frecuencia de colonización
d	día
EDTA	etilendiaminotetraacetato
EF-1alfa	factor de elongación 1 alfa
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus
FAA	formaldehído 37% ácido acético
HCl	ácido clorhídrico
IBA	ácido indolbutírico
ITS	espacios de transcripción interna 2
KOH	hidróxido de potasio



---

M	molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
ML	maximun linkelihood
mm	milímetros
mM	milimolar
Mn	manganeso
MS	Murashigue-Skoog
MS/4	¼ Murashigue-Skoog
N	nitrógeno
N	normalidad
nm	nanómetro
ng	nanogramos



---

NUV	near ultraviolet light
P	fósforo
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	electroforesis de campo pulsado
pH	potencial H <sup>+</sup>
p/v	peso sobre volumen
PPFD	flujo de fotones fotosintéticos
REP-PCR	repetitive extragenic palindromic
rpm	revoluciones por minuto
RITA	Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado
SNA	Spezieller Nährstoffamer Agar
TBE	Tris-borato EDTA
TSA	triptona soja agar



---

UV	luz ultravioleta
U	unidades
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean
$\mu\text{l}$	micro litro
$\mu\text{m}$	micrómetro
$\mu\text{M}$	micromolar
V	voltios
v/v	volumen en volumen
ZEA	zeatina





## RESUMEN

Argentina es el primer productor mundial de yerba mate, las provincias productoras son Misiones y Corrientes. Este cultivo presenta varios inconvenientes, como la baja calidad genética y fisiológica de las semillas, la lenta y desuniforme germinación con un bajo porcentaje y la heterogeneidad de las plantas obtenidas a partir de semillas, que llevaron a la micropropagación. Una de las mayores dificultades en la micropropagación de yerba mate es la contaminación *in vitro* por hongos y bacterias. Entre los diversos factores que pueden influir en la contaminación de cultivo *in vitro* están la época del año, el tipo de explante y la presencia de microorganismos superficiales y/o endófitos asociados a las plantas.

Los microorganismos endofíticos fueron encontrados en todas las plantas estudiadas en diferentes órganos vegetales, si bien su relación con las plantas no son comprendidas en su totalidad, se encontraron que producen efectos benéficos sobre sus hospedantes, cumpliendo algún rol importante para la fisiología de la planta, sin embargo cuando éstos se encuentran en explantes cultivados *in vitro* son considerados contaminantes. Su control se hace dificultoso debido a que al habitar los tejidos vegetales internos sobreviven a la desinfección superficial.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar a los microorganismos contaminantes de sistemas de micropropagación de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) con el fin de determinar su origen.

Existen muy pocos antecedentes sobre microorganismos endofíticos en la yerba mate, para ello en este trabajo se realizaron muestreos de hojas y tallos de plantas crecidas en el campo en diferentes fechas. Además, para confirmar que los contaminantes del cultivo *in vitro* de yerba mate son en su mayoría endófitos de plantas crecidas en el campo y/o invernadero, se aislaron contaminantes en la micropropagación de yerba mate y se realizaron muestreos de hojas y tallos de plantas crecidas en invernadero. Para la identificación de microorganismos se usaron la técnica morfológica y molecular amplificando por PCR y secuenciando el ITS para hongos y 16S para bacterias.

De los endófitos aislados de plantas crecidas en el campo se identificaron 14 géneros de hongos *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gliocladium* (*Bionectria*), *Guignardia* (*Phyllosticta*), *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phomopsis* (*Diaporthe*) y *Trichoderma*, y 20 géneros de bacterias, *Aeromicrobium*, *Bacillus*, *Brevundimonas*,



*Curtobacterium*, *Herbiconiux*, *Kineococcus*, *Leucobacter*, *Lysinibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Phenylobacterium*, *Rhizobium*, *Roseomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* y *Xylophilus*. Los géneros de hongos *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Setophoma*, y de bacterias *Pantoea*, *Staphylococcus* fueron aislados como contaminantes de cultivo *in vitro* y como endófitos de plantas crecidas en invernadero y a campo. *Alternaria* fue el género de hongo que se aisló como contaminante de cultivo *in vitro* y como endófito de plantas crecidas a campo al igual que las bacterias *Janibacter*. También se determinó que el género de hongo que se encontró en mayor número fue *Fusarium*, se identificaron 8 especies y se probó la patogenicidad de 3 de ella en cultivo *in vitro* de yerba mate (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum* y *F. subglutinans*) y se determinó que pueden ser endófitos en plantas crecidas en el campo y patógenos en el cultivo *in vitro* (vitropatógenos).

Con los resultados de este trabajo se pudo confirmar que la mayoría de los contaminantes en cultivo *in vitro* son microorganismos endofíticos presentes en plantas crecidas a campo o en invernáculo que no afectan negativamente el crecimiento en condiciones *ex vitro*. Además, se determinó que el número de aislamientos y diversidad de hongos y bacterias están influenciados por la época de muestreo, presentándose los mayores valores en otoño y verano, además están influenciados por el tipo de órgano vegetal y su edad.



## SUMMARY

Argentina is the world's largest yerba mate producer; the producing provinces are Misiones and Corrientes. This crop has several drawbacks such as low genetic and physiological seed quality, slow, even and low percentage germination and heterogeneity of plants grown from seed, which led to the necessity of developing micropropagation systems. One of the major difficulties in the yerba mate micropropagation is *in vitro* contamination by fungi and bacteria. Among the various factors that can influence the contamination of *in vitro* culture are the time of year, type of explant and the presence of surface and/or endophytic plant-associated microorganisms. Since endophytes live within plant tissues, they are able to survive surface disinfection making them harder to control. The aim of this work was to characterize the microorganisms contaminant of yerba mate micropropagation systems and establish their source.

The composition and diversity of the endophytic community associated with aerial organs of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) was investigated using culture-depending methods. Fungal and bacterial endophytes were isolated from young and adult leaves and branches of three yerba mate clones growing under field condition in Corrientes province, Argentina. Besides, in order to establish if most of the contaminants of yerba mate *in vitro* culture corresponded to endophytes from field or greenhouse growing plants, contaminant microorganisms were isolated from *in vitro* micropropagated, and greenhouse plants. Fungi were identified based on their micromorphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) rDNA sequence analysis; for bacteria 16S rDNA sequence analysis was used.

A total of 156 fungal and 193 bacterial isolates were obtained. Bacteria predominated in stem samples while leaf samples retrieved similar amount of bacterial and fungal isolates. No significant differences were found in isolate quantity nor diversity among seasons or between young and older leaves and stems. The most frequently isolated fungus was *Fusarium*, followed by *Colletotrichum*; they were both present in all the sampling seasons and organ types assayed. Other 12 fungus genera were identified including *Aspergillus*, *Cercospora*, *Clonostachys* (*Bionectria*), *Curvularia*, *Guignardia*, *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phomopsis* (*Diaporthe*), and *Phyllosticta*. Actinobacteria represented 61% of all bacterial isolates. The most dominant bacterial taxa were *Curtobacterium* and *Microbacterium*. They were isolated from all the organs assayed,



showing that they are ubiquitous endophytes. Other bacteria frequently found throughout the year were *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Herbiconiux* and *Bacillus*. The predominant fungi and bacteria detected in yerba mate were similar to those reported in other species in which the same type of technique was used. Fungal genera *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Setophoma*, and bacteria *Pantoea* and *Staphylococcus* were isolated as contaminants of *in vitro* culture and as endophytes in plants grown under greenhouse and field conditions. *Alternaria* was t isolated as a contaminant of *in vitro* culture and as endophyte in plants grown in the field, as well as the bacteria *Janibacter*. *Fusarium* was the most numerous fungal genus. 8 *Fusarium* species were identified, and pathogenicity on yerba mate was assayed in three of them (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum* y *F. subglutinans*), showing that they behave as endophytes when plants are grown under field conditions but are pathogenic to *in vitro* plants (vitropathogens).

The results obtained in this thesis showed that most of the yerba mate *in vitro* culture contaminants are endophytic microorganisms that occur also in field or greenhouse grown plants without showing any negative effect on *ex vitro* plants. We have also determined that the number and diversity of fungal and bacterial isolates are affected by the season, being higher during fall and summer, as well as the organ type and age.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL





## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. YERBA MATE

#### 1.1. Cultivo de yerba mate

*Ilex* (Aquifoliaceae) es el género que posee más representantes dentro de las plantas leñosas dioicas. Se encuentra distribuido en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales o subtropicales y comprende entre 400 y 500 especies (Giberti, 1994a; Loizeau *et al.*, 2005; Kvacek *et al.*, 2009). Aunque el género es casi cosmopolita, la mayoría de las especies viven en América del Sur y sudeste de Asia y, en menor medida, en América del Norte. La yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), es nativa de América del Sur y crece en Argentina, Brasil y Paraguay (Giberti, 1994a; Manen *et al.*, 2002).

La yerba mate es un árbol perennifolio, dioico, de hasta 30 m de altura, pero en yerbales cultivados se mantiene como arbusto mediante podas. El árbol de la yerba mate constituye la principal especie del género utilizada con fines industriales cuyas hojas son usadas para preparar una infusión muy popular llamada “mate”, la cual es altamente apreciada por su sabor y sus propiedades como estimulante debido a su contenido de cafeína y teobromina (Filip *et al.*, 2001; Schinella *et al.*, 2005). El primer productor mundial es la Argentina con 62%, seguida por Brasil con 34% y Paraguay con 4%. En Argentina crece en las provincias de Misiones, con el 90% de la superficie cultivada y nordeste de Corrientes con 10% (Mayol *et al.*, 2014). Requiere suelos lateríticos, ácidos, profundos, de textura media a fina, sin impedimentos físicos ya que no tolera condiciones de anegamiento (Lysiak, 2010). El cultivo de la yerba mate ocupa el 50% de la superficie agrícola en la provincia de Misiones, donde representa el 22% de la mano de obra ocupada en el sector primario y el 15% de la mano de obra empleada en el sector manufacturero. Constituye, en términos de valor de producción, la primera actividad industrial (25%) en un mismo nivel con la elaboración de pasta celulósica (Gortari, 1997).

## 1.2. Micropropagación de yerba mate

La micropropagación de yerba mate comenzó a realizarse debido a los inconvenientes generados por la baja calidad genética y fisiológica de las semillas (Sturion, 1988), el prolongado tiempo necesario para la estratificación, la lenta y desuniforme germinación (Prat Kricun, 1993; Menna, 1995) con un bajo porcentaje (Menna, 1995; Sturion, 1988) y la heterogeneidad de las plantas obtenidas a partir de semillas (Mroginski *et al.*, 1996). Además, las semillas presentan dormancia debido a que los embriones se encuentran morfológicamente inmaduros (Hu, 1975; Fowler y Sturion, 2000), con una proporción de embriones maduros de 1% (Niklas, 1987). También presentan parte del endocarpo leñoso (Medeiros, 1998) y adormecimiento tegumentar (Fowler y Sturion, 2000). Todos estos factores contribuyen a elevar el costo de producción de plantas semilleras, además de limitar secuencias de programas de mejoramiento genético de especie.

Se han logrado poner a punto sistemas de micropropagación, como cultivo *in vitro* de segmentos nodales y meristemas apicales (Sansberro *et al.*, 1999, 2000), cultivo de embriones (Rey *et al.*, 2002), embriones rudimentarios (Sansberro *et al.*, 1998), pirenos bisectados (Dolce *et al.*, 2010) y sistema de inmersión temporal con bioreactores, RITA (Luna, 2010). Una de las mayores dificultades en estos sistemas de cultivo *in vitro* es la gran contaminación con hongos y bacterias, junto a la oxidación inicial de los explantes (Bernasconi *et al.*, 1998). En otros trabajos se han reportado niveles de contaminación de entre el 20 y el 90 % de los explantes, registrándose los valores más altos cuando los explantes provenían directamente de plantas madres que crecen en el campo (Mroginski *et al.*, 1996, 1997; Sansberro *et al.*, 2001). En otra especie, *Ilex dumosa*, la proliferación de bacterias endógenas en medio líquido debió ser controlada mediante el uso de antibióticos (Luna *et al.*, 2008).

Se ha señalado para muchas especies de leñosas, que uno de los factores que influye en la contaminación es la época del año en que son cultivados los explantes. Esto se debe, probablemente, a las condiciones ambientales asociadas al incremento de humedad relativa y las elevadas temperaturas que favorecen al desarrollo de hongos y bacterias. Segmentos nodales de yerba mate cultivados en los meses de invierno, por ejemplo, resultaron en la mayoría de los cultivos contaminados (Bernasconi *et al.*, 1998). Esto también ocurre en otras especies de plantas, por ejemplo en *Pinus tabuliformis* se

encontró que la época en que ocurría mayor colonización de hongos era la primavera, siendo en verano el momento de menor presencia de estos microorganismos (Guo *et al.*, 2008). En *Camellia japonica* la presencia de hongos también fue mayor en los meses de primavera e invierno (Osono, 2008).

La contaminación de los cultivos *in vitro*, dependiendo del tipo de explante que se utilice, puede deberse a la presencia de microorganismos superficiales y/o endofíticos asociados a los tejidos de las raíces, los tallos y hojas de las plantas o provenientes del ambiente de trabajo e introducidos a través de los procedimientos de laboratorio (Leifert *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2006). Los microorganismos superficiales y los de laboratorio, como los hongos filamentosos, las levaduras y bacterias comunes del ambiente, son patógenos para el cultivo de tejidos, invadiendo rápidamente al explante. Éstos resultan fácilmente visibles debido a que los medios de cultivo para plantas contienen los nutrientes esenciales requeridos para su crecimiento (Leifert *et al.*, 1994). Por otra parte, los microorganismos que pueden estar presentes intercelularmente en los tejidos vegetales, pueden permanecer latentes en el explante y expresarse en los cultivos después de varios subcultivos (contaminantes subliminales), en un mismo medio o cuando se cambia la composición de los mismos al pasar de una etapa de multiplicación a la de enraizamiento, por ejemplo. Este hecho se debe a que el crecimiento de los microorganismos puede ser inhibido por las altas concentraciones de sales o sacarosa que contienen los medios de cultivo y por las condiciones de pH (Cassells, 1991). Si bien todos los tipos de contaminantes pueden causar pérdidas económicas al micropropagador, matando al explante o debilitándolo, los contaminantes subliminales o latentes son los más peligrosos ya que afectan a cultivos ya establecidos (Leifert y Cassells, 2001). Estos son responsables de pérdidas durante cada uno de los pasos en el proceso de micropropagación, afectando particularmente a la producción de plantas libres de patógenos (Kamoun *et al.*, 1997).



## 2. MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Los microorganismos endofíticos fueron mencionados por primera vez a principios del siglo XIX por De Bary (1866), quien los diferenció de los microorganismos patógenos de plantas por ser asintomáticos, que no producían efectos perjudiciales ni benéficos sobre los hospedantes. A fines de los años 70 se demostró que muchos de estos microorganismos poseían una serie de propiedades de interés, como por ejemplo conferir protección contra insectos plagas, otros microorganismos patógenos y herbívoros (Azevedo, 1998). Actualmente, se define a los endófitos como organismos que viven dentro de los tejidos de las plantas, formando asociaciones biotróficas intercelulares, sin producir daño. Asimismo, Schulz y Boyle (2005) utilizaron el término endófito para describir aquellas bacterias y hongos que se pueden detectar en un momento particular en tejidos aparentemente sanos de plantas hospederas.

Hongos y bacterias endofíticas se han encontrado en prácticamente todas las especies de plantas estudiadas, tanto en herbáceas como en leñosas (Saikkonen *et al.*, 1998; Bacon y Hinton, 2006, Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Los pocos ejemplos de aparente ausencia de poblaciones endofíticas pueden deberse a que algunos microorganismos no son fáciles de aislar o cultivar (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). En las plantas se los ha encontrado en diferentes órganos vegetales incluyendo semillas, raíces, tallos y hojas (Danhorn y Fuqua, 2007). Tanto hongos como bacterias pueden colonizar la raíz inter o intra-celularmente y lo hacen en forma sistémica, sin embargo difieren en su modo de colonizar. Las bacterias primero colonizan intercelularmente (Hinton y Bacon 1996; Hallmann *et al.* 1997; Schulz y Boyle, 2005) aunque luego también se encuentren intracelularmente (Hurek *et al.* 1994), por ello son frecuentemente encontradas en tejidos vasculares (Kobayashi y Palumbo, 2000), lo cual le permite distribuirse a lo largo de la planta. Sin embargo, la raíz no es la única entrada posible de estos microorganismos a la planta, también pueden entrar por estomas o bien por heridas (McCully, 2001). Esto le permite a los microorganismos endofíticos hospedarse en todas las partes de las plantas. Los endófitos pueden estar presentes en un ambiente metabólicamente hostil encontrando continuamente metabolitos secundarios de defensa del huésped (Schulz *et al.*, 1999). En general, pueden establecer tanto asociaciones a largo plazo como asociaciones transitorias permaneciendo inactivos o latentes (Bacon *et al.*, 2002; Bacon y Hinton, 2006). La asociación de

microorganismos juega un rol importante en la agricultura, los alimentos y contribuyen al equilibrio ambiental (Montesinos, 2003).

Algunos estudios demostraron que los endófitos no son hospedantes específicos (Cohen, 2006). Varios factores, tales como genotipo de la planta o la composición del suelo, puede seleccionar a favor o en contra de ciertas especies y cambiar su actividad a lo largo del espectro de mutualismo a parasitismo (Danhorn y Fuqua, 2007). De esta manera, las poblaciones de endófitos de una planta pueden estar influenciados por factores como el origen y edad de la planta, el tipo de tejido, el ambiente y momento del muestreo (Zinniel *et al.*, 2002; Pirttilä *et al.*, 2005).

Si bien las interacciones entre plantas y microorganismos no son comprendidas totalmente hasta la actualidad, se han encontrado hongos y bacterias con efectos benéficos sobre sus hospedantes, cumpliendo algún rol importante para la fisiología de la planta como ser fijadores de nitrógeno (Sevilla *et al.*, 2001; Hurek *et al.*, 2002; Iniguez *et al.*, 2004;), productores de fitohormonas (auxinas, citocininas y giberelinas) (Sessitsch *et al.*; 2002, Hamayun *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2009), mejoradores de la disponibilidad de minerales a partir del reciclado y solubilización de los mismos a sus formas asimilables para las plantas (Ca, Fe, Mn, P, N), productores de sustancias orgánicas (Ryu *et al.*, 2003; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Pirttilä *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2008;), degradadores de compuestos recalcitrantes en sitios contaminados (Siciliano *et al.*, 2001, Gaur y Adholey, 2004, Soleimani *et al.*, 2010), desencadenantes biológicos para activar respuesta a diferentes tipos de estrés como ser el estrés abiótico (Kjøller y Rosendahl, 2000; Malinowski *et al.*, 2000, Redman *et al.*, 2002; Partida-Martínez y Heil, 2011), entre otros. Además, se ha reportado que liberan sustancias antibacterianas (Banger y Thomashow, 1996; Blumer y Haas, 2000; Moore *et al.*, 2006; Jalgaonwala *et al.*, 2011) y antifúngicas (Hanada *et al.*, 2010), producen sideróforos (O'Sullivan y O'Gara, 1992, Bartholdy *et al.*, 2001, Sessitsch *et al.*, 2002; Sturz *et al.*, 2000) e inducen la resistencia sistémica contra patógenos (Madhaiyan *et al.*, 2004). Estas funciones los presentan como candidatos para el control biológico y promotores de crecimiento. La aplicación de diferentes herramientas innovadoras ayudaría en el fortalecimiento de la comprensión de las interacciones planta-microorganismo, produciendo nuevos componentes bioactivos para el crecimiento de las plantas y mejorar la actividad de biocontrol, disminuyendo los desechos que dañan el ecosistema. Teniendo en cuenta todo esto, definitivamente los

endófitos han demostrado ser de gran aporte y han dejado un buen impacto en las plantas, el medio ambiente y los seres humanos (Nair y Padmavathy, 2014).

Los criterios para reconocer a los verdaderos endófitos comprenden no sólo el aislamiento de tejidos desinfectados, sino también la observación microscópica de éstos dentro de los tejidos del vegetal (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Por otra parte, la aplicación de técnicas moleculares que no requieren el cultivo de los microorganismos han permitido detectar una mayor diversidad de especies que las obtenidas por el cultivo de endófitos (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Existen dos enfoques para la caracterización de microorganismos, fenotípica y genotípica. Los métodos fenotípicos se basan en las características bioquímicas y/o fisiológicas (expresión del genotipo) mientras que los métodos genotípicos se basan en el estudio del genoma del microorganismo (moléculas de ARN y ADN).

El enfoque fenotípico depende del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su caracterización tradicional (aspecto de colonia, presencia de flagelos, movilidad, coloraciones y utilización de hidratos de carbono). Incluye pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las morfológicas se basan en las características macroscópicas y microscópicas de las colonias. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado el estudio de la diversidad microbiana, ya que se determinó que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados con técnicas tradicionales, debido a que dichos microorganismos dependen de las actividades de otros seres vivos o porque no se conocen las condiciones para su cultivo (Amann y Kühn, 1998). Además, otro inconveniente es que requiere de expertos y especialistas con experiencia en la identificación de microorganismos (Sedlář *et al.*, 2009).

El enfoque genotípico, basado en métodos moleculares han permitido incrementar el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas y permiten incorporar otros criterios clasificatorios basados en el análisis genómico como por ejemplo, presencia o ausencia de un gen, variabilidad en una determinada secuencia o expresión de una proteína determinada (Versalovic y Lupski, 2002). Los métodos moleculares pueden estar basados en el análisis de polimorfismos de secuencias repetidas, de elementos variables o del genoma completo de los microorganismos. Las técnicas moleculares para genotipificación pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: a) aquellas

basadas en el estudio del electrocariotipo (de un segmento del genoma o del genoma completo) mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE), b) las relacionadas con la amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), c) las que involucran la secuenciación parcial o total del genoma de los microorganismos y, d) aquellas en las cuales se obtienen perfiles mediante la hibridación de ácidos nucleicos (Vílchez y Alonso, 2009). La diversidad genotípica revelada puede resultar tan grande que dificulte la identificación y clasificación. Sin embargo, en muchos casos la caracterización genotípica no alcanza para la clasificación de un determinado grupo o conduce a agrupamientos incorrectos.

Los inconvenientes tanto de metodologías fenotípicas como genotípicas han llevado a la necesidad de combinar ambos tipos de técnicas a través de una taxonomía polifásica para lograr la caracterización de una población (Graham *et al.*, 1991). Cada uno de esos métodos permite alcanzar un cierto nivel de clasificación filogenética, de género, especie, subespecie, biovariedad y hasta el nivel de cepa (Rademaker y Bruijn., 1997).

Las técnicas de amplificación por PCR logran determinar la variabilidad en las secuencias de ADN, lo que permite diferenciar especies o cepas estrechamente relacionadas y detectar microorganismos sin que presenten en el huésped síntomas visibles. Los genes que codifican el ARN ribosomal son los más utilizados. Esto se debe a que estas moléculas son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos. En el caso de los procariotas, el ADNr 16S (que contiene aproximadamente 1.500 nucleótidos) es el más utilizado (Felske *et al.*, 1999; Madigan, 2000) debido a que posibilita encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacteriano. En el caso de eucariotas, subunidades 18S, 5,8S y 28S del ARN permiten la clasificación e identificación de hongos (Martin y Rygiewicz, 2005; Nilsson *et al.*, 2008), y las regiones entre los genes mencionados (no altamente conservadas) espacios de transcripción interna 1 y 2 (ITS1 e 2), permiten reconocer hongos a nivel de género y especie (Carlile *et al.*, 2001; Mitchell y Zuccaro, 2006).

## 2.1. Microorganismos endofíticos en cultivos *in vitro*

Las células vegetales que crecen en cultivos *in vitro* son consideradas bajo algún grado de estrés y pueden estar predispuestas a infecciones, tanto de bacterias patógenas como no patógenas (Bradbury, 1970). Por otra parte el medio de cultivo contiene diferentes nutrientes ricos para hongos y bacterias, además de los exudados de las células vegetales. Los contaminantes *in vitro* son denominados “vitropatógenos”, este término engloba a microorganismos, comúnmente hongos, bacterias y levaduras, y menos frecuentes virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips). Este término es usado para organismos que no necesariamente son patógenos de plantas en el campo pero que si son perjudiciales para el cultivo *in vitro* (Leifert *et al.*, 1989, 1994).

Si bien los microorganismos endofíticos pueden ser beneficiosos para las plantas en algunos aspectos, como fue explicado anteriormente, cuando éstos se encuentran en explantes cultivados *in vitro* son considerados contaminantes, siendo el logro de plantas axénicas uno de los objetivos principales del cultivo *in vitro* (Nair y Padmavathy, 2014). La existencia de hongos y bacterias endofíticas constituye el factor responsable de las mayores pérdidas por contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. Estos microorganismos, habitan los tejidos vegetales internos, lo que les permite sobrevivir a la desinfección superficial, y una vez establecido el cultivo se hacen visibles al principio, mayormente hongos, y/o luego de varios subcultivos, generalmente bacterias (Leifert *et al.*, 1994; Thomas, 2004).

Se han desarrollado protocolos para superar los problemas de contaminación *in vitro*. El proceso de desinfección es muy importante para el aislamiento de bacterias y hongos endofíticos, ya que éste debe ser lo suficientemente eficiente para eliminar a los contaminantes superficiales, sin afectar a la población de microorganismos dentro de los tejidos (Bacon *et al.*, 2002). Existen otras estrategias de control y prevención como la selección y el tratamiento de las plantas madres (Niedz y Bausher, 2002), el control con antibióticos (Luna *et al.*, 2008 y 2013), y el cultivo de meristemas (Cassells, 1991).

## 2.2. Microorganismos endofíticos en yerba mate

A nivel mundial existen muy pocos antecedentes sobre microorganismos endofíticos en la yerba mate. En Argentina fueron aisladas dos bacterias endofíticas como contaminantes de cultivo *in vitro* de yerba mate que fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* (Luna *et al.*, 2013) y *Enterobacter* sp. aislada de raíz (Collavino *et al.*, 2010). En Brasil, en muestras de hojas desinfectadas, se encontraron géneros de hongos como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* y *Verticillium* (Pimentel, 2006).

## 3. HIPÓTESIS

Los contaminantes del cultivo *in vitro* de yerba mate son en su mayoría endófitos de plantas crecidas en el campo y/o invernáculo.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a los microorganismos contaminantes de sistemas de micropropagación de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) con el fin de determinar su origen.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar e identificar los hongos y bacterias endofíticos en plantas de yerba mate crecidas en invernáculo y en el campo.
2. Caracterizar e identificar hongos y bacterias contaminantes en cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate.
3. Establecer la posible procedencia (planta de campo, de invernáculo o contaminantes de trabajo) de los microorganismos detectados en cultivos de tejidos.

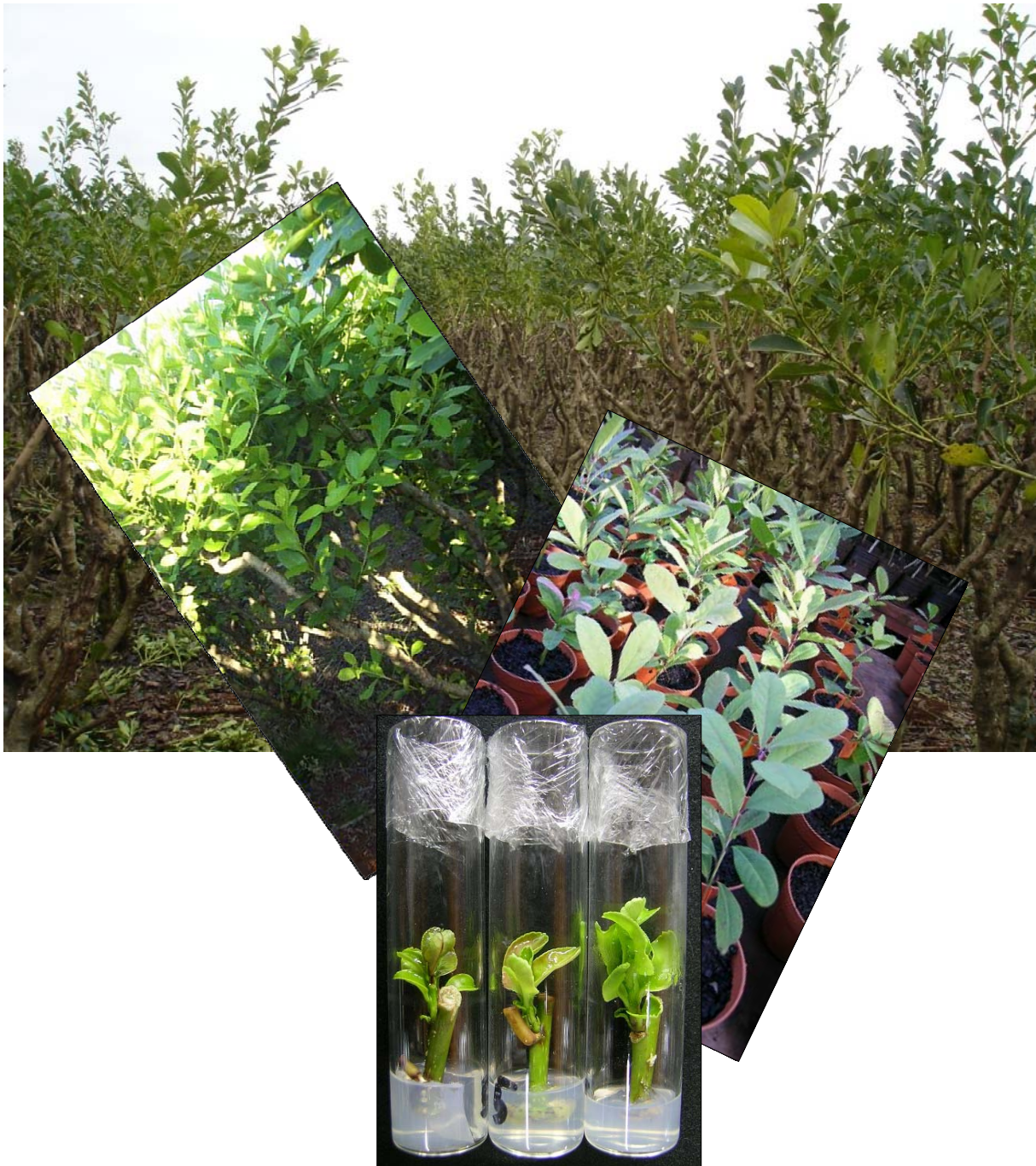


4. Evaluar la relación de la variación estacional de los microorganismos endofíticos caracterizados.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CULTIVO *IN VITRO*

#### 1.1. Cultivo de segmentos nodales de yerba mate

El cultivo *in vitro* de segmentos nodales se realizó para la caracterización de contaminantes (hongos y bacterias) en la primera etapa de la micropropagación. Se trabajó con 2 clones (Clon SI-49 y 67) de yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) que crecían en condiciones de invernadero en el laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET-UNNE) y Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE). Dichos materiales fueron gentilmente cedidos por la EEA INTA Cerro Azul y por el Establecimiento Las Marías S.A.C.I.F.A.

Se establecieron *in vitro* segmentos nodales (1,5 - 2 cm de longitud, conteniendo una yema axilar) provenientes de ramas jóvenes no lignificadas, los cuales fueron desinfectados mediante inmersión en alcohol etílico 70% durante 1 min y luego en una solución de lavandina (conteniendo 1,5% de NaOCl, concentración final) + Triton<sup>®</sup> X-100 al 0,1% durante 30 min; realizándose posteriormente 3 enjuagues con agua destilada estéril (Sansberro *et al.*, 2000). A continuación, los explantes desinfectados fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 11 cm<sup>3</sup> de capacidad conteniendo 3 ml de Medio basal de Murashige y Skoog (1962) (MS) cuya concentración salina fue reducida cuatro veces (MS/4), conteniendo 3% de sacarosa (Bernasconi *et al.*, 1996). El pH del medio nutritivo fue ajustado a 5,8 con hidróxido de potasio o ácido clorhídrico antes de la adición del agente gelificante agar 0,65% (A-1296; Sigma Chem. Co.). Los tubos conteniendo los medios de cultivo fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados en autoclave (1,45 kg.cm<sup>-2</sup> y 120°C) durante 20 min. Una vez cultivados los explantes, los tubos fueron sellados con Resinite AF 50<sup>®</sup> (Casco S.A.I.C. Company, Bs. As.) e incubados en un cuarto climatizado a 27±2 °C y con un fotoperíodo de 14 h (intensidad lumínica de 116 μm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD). Los cultivos fueron observados diariamente para determinar la aparición de algún contaminante (hongo y/o bacteria), y luego se procedió al aislamiento del mismo.

## 1.2. Cultivo de embriones

El cultivo *in vitro* de embriones se realizó para obtener plántulas de yerba mate que fueron posteriormente utilizadas para realizar pruebas de patogenicidad de hongos endofíticos de yerba mate. Se trabajó con semillas provenientes de frutos maduros (alrededor de 3 meses después de la polinización) de *I. paraguariensis* tomados al azar a partir de árboles que crecían en el establecimiento Las Marías S.A. (Gobernador Virasoro, Corrientes).

Una vez cosechados los frutos se eliminó el exocarpo carnoso y se procedió a desinfectar las semillas mediante inmersión en etanol 70% durante 5 min seguido de una doble inmersión en una solución de NaOCl al 1,8% + Triton<sup>®</sup> X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) durante 30 min cada una; realizándose posteriormente tres enjuagues con agua destilada estéril. A continuación, los embriones inmaduros (0,18 - 0,26 mm de largo) fueron aislados y cultivados sin el endosperma siguiendo el procedimiento descrito por Sansberro y colaboradores (2001). Los embriones fueron aislados con la ayuda de un microscopio estereoscópico, trabajando en una cabina de flujo laminar de aire estéril, y cultivados sobre 3 ml de medio nutritivo semisólido en tubos de vidrio de 11 cm<sup>3</sup> de capacidad (un explante/tubo). El medio de cultivo estaba constituido por MS/4, conteniendo 3% de sacarosa y suplementado con 0,1 mg l<sup>-1</sup> de ZEA, de acuerdo a Sansberro y colaboradores (1998). El pH de los medios fue ajustado a 5,8 con hidróxido de potasio o ácido clorhídrico antes del agregado de 0,65% de agar (A-1296; Sigma Chem. Co.).

Los tubos conteniendo el medio nutritivo fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados en autoclave (1,45 kg cm<sup>-2</sup> y 120 °C) durante 20 min. Una vez cultivados los explantes (200), los tubos fueron sellados con Resinite AF 50<sup>®</sup> (Casco S.A.I.C. Company, Bs. As.) e incubados a 27±2 °C en oscuridad permanente durante los primeros 30 d, luego de lo cual fueron transferidos a un cuarto climatizado a la misma temperatura y con un fotoperíodo de 14 h (intensidad lumínica de 116 μm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPF). La germinación de los embriones comenzó a observarse aproximadamente a los 30 días de cultivados, que se caracterizó por la elongación de la radícula seguida por la inmediata elongación del hipocótilo y la expansión de los cotiledones.

## **2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS**

### **2.1. Segmentos nodales cultivados *in vitro***

La contaminación en cultivo *in vitro* se evaluó en 10 tubos/clon, con tres repeticiones. Luego de 15 días de realizado el cultivo de segmentos nodales se procedió al aislamiento de hongos y bacterias contaminantes. Las colonias fúngicas fueron resembradas en cajas de Petri conteniendo APG (Britania) y estreptomicina 100 mg/l para inhibir el crecimiento de bacterias. Las bacterias se resembraron en cajas de Petri conteniendo agar TSA y cicloheximida 100 mg/l para inhibir el crecimiento de hongos. Las cajas se incubaron en estufa sin luz a 27 °C durante 1 semana, una vez crecidas las colonias fueron reaisladas para obtener cultivos puros, luego se procedió a la identificación morfológica a nivel de género para hongos y la caracterización molecular para hongos y bacterias.

### **2.2. Plantas en condiciones de invernáculo**

Se analizó la población endofítica, de tallos y hojas de plantas de yerba mate aparentemente sanas de dos clones (SI49 y 67) que crecían en macetas de 4 l en un invernáculo del laboratorio de cultivo de tejidos del IBONE. Se tomaron muestras de ramas jóvenes y adultas. Las ramas jóvenes correspondieron a brotes de 1 ó 2 meses y las adultas a ramas con más de 4 meses. El total de muestras analizadas fue de 24, tanto para hongos como para bacterias (2 clones x 3 plantas x 2 órganos x 2 edad tejidos).

### **2.3. Plantas en condiciones de campo**

En el campo, se muestrearon tallos y hojas de yerba mate de tres clones (SI-49, LM y G18) crecidas en un lote experimental clonal de Las Marías S.A. C.I.F.A. (Gobernador Virasoro, Corrientes). Se realizaron 6 muestreos en diferentes fechas, Junio, Octubre y Diciembre del año 2010, Junio, Agosto y Diciembre de 2011. Al igual que para las plantas de invernáculo se tomaron ramas jóvenes y adultas. El total de muestras analizadas fue 216 tanto para hongos como para bacterias (3 clones x 3 plantas x 2 órganos x 2 edad tejido x 6 muestreos).

Las condiciones de las plantas en el cultivo variaron debido a las características de manejo del mismo.

Junio: se realizó la poda “melena” que consiste en el viruteo, extracción de ramas delgadas de la parte inferior de la planta, y en la poda de limpieza, extracción de todas las ramas improductivas. Antes de dicha poda el lote representaba un área foliar entre 80 y 90%, y es cuando se realizaron los muestreos Junio de 2010 y 2011.

Julio: se practicó la poda “bandera”, que consiste en la extracción de ramas verticales con aumento de 15 cm de longitud y de un diámetro superior a 2 cm. Luego de esta poda se realizó el muestreo de Agosto de 2011.

Septiembre: se realizó la última poda realizada en el año, la poda “mesa” o “parejo”, la cual consiste en cortar todas las ramas vigorosas de 2 cm de diámetro y de aproximadamente 2 metros de largo, esta cosecha representa la mayor proporción de cosecha y con esta se logra eliminar el leño dejando a la planta con tallos productivos para el año siguiente. Luego de esta poda se realizó el muestreo de Octubre, donde solamente se obtuvieron tallos adultos por ausencia de jóvenes (o brotes). Los muestreos de Diciembre se realizaron a fin de mes donde las plantas ya presentaban brotes, además de tallos adultos productivos.

#### **2.4. Técnicas de aislamiento**

Las ramas fueron lavadas con agua corriente durante 10 segundos y luego desinfectadas. El método de desinfección utilizado fue el mismo usado para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate (Sansberro *et al*, 2000). Una vez desinfectado el material vegetal, se procedió a realizar cortes de hojas y de tallos. Se tomaron dos porciones de cada hoja de 1 cm<sup>2</sup>, cortadas de la parte media de la lámina, y dos porciones de cada tallo de 1 cm de longitud, cortadas de la parte media del tallo. En ambos casos, una de las porciones se utilizó para el aislamiento de hongos y la otra para el de bacterias.

Para el aislamiento de hongos, las porciones de hojas y tallos fueron sembradas en cajas de Petri con APG y estreptomycin 100 mg/l para minimizar el crecimiento de bacterias. Para el aislamiento de bacterias las porciones de hojas y tallos fueron maceradas en microtubos con morteros adaptados para los mismos, luego se extrajo el jugo vegetal y se diluyó con agua destilada estéril (dilución 1:10, 20 µl de jugo vegetal en 180 µl de agua) y se sembraron 70 µl de la dilución que se rastrilló en cajas de Petri con TSA y cicloheximida para minimizar el crecimiento de hongos. En ambos casos, las cajas fueron incubadas en estufa sin luz a 27°C durante 1 semana.

Después de purificar las colonias fúngicas desarrolladas en APG, algunos aislamientos puros fueron transferidos a medios semiselectivos para inducir su crecimiento típico y esporulación. Los aislamientos correspondientes a *Fusarium* fueron transferidos a medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) con tiras de papel de filtro (Leslie y Summerell, 2006). La carboximetilcelulosa del papel de filtro favorece la formación de estructuras típicas del género. Otros cultivos no esporulantes fueron transferidos a medio de tallos de soja estériles sobre agar harina de maíz para inducir su esporulación o la producción del estado teleomorfo (Dhingra y Sinclair, 1986). Todos los cultivos fúngicos con medios semiselectivos, para inducir a la esporulación, fueron incubados en cámara climática bajo períodos de alternancia de 12/12 horas de oscuridad/luz (irradiación provista por tubos de NUV (tubos Near Ultraviolet light, o tubos negros con un pico de máxima emisión en 360 nm) y temperatura de 22-25° C. La identificación se realizó entre los 5 y 10 días de incubación.

Las colonias fúngicas y bacterianas fueron transferidas a cajas de Petri con APG con estreptomycinina y TSA con cicloheximida respectivamente, para obtener aislamientos puros.

### **3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA**

#### **3.1. Hongos**

Una vez aisladas y purificadas las diferentes colonias de hongos, la presencia de crecimiento fúngico sobre la superficie de la caja de Petri fue confirmada directamente a simple vista y subsecuentemente se procedió a la identificación de los mismos utilizando microscopio esteroscópico y óptico. El tejido fúngico (micelio, cuerpos fructíferos o estructuras de esporulación) fue extraído con aguja de vidrio a un portaobjeto con una gota de agua para ser examinado al microscopio óptico.

Anamorfos: los de “conidios secos” se colocaron en el portaobjeto con una gota de alcohol para dispersar la masa de conidios hidrofóbicos antes de cubrir la preparación con el cubre objeto. Para cuerpos fructíferos se tomó la estructura de esporulación con 2 agujas de vidrio, incluyendo partes del agar, desde el borde de la colonia y se hicieron cortes para observar la morfología de la célula conidiógena y el tipo de conidios. En algunos casos sobre todo en estructuras frágiles como cadenas de “conidios húmedos” (tipo *Fusarium*), se usó cinta adhesiva transparente levemente presionada sobre la colonia. La cinta fue transferida al portaobjeto con una gota de agua y se cubrió con el cubreobjeto.

En el caso de Hyphomycetes los caracteres considerados fueron: conidióforos, células conidiógenas, y conidios (forma, color y septación). Para el género *Fusarium*, la morfología de los esporos (macro y microconidios) fue el principal carácter, además del tipo de célula conidiógena (mono versus polifialídica), clamidosporas y esporodoquios. El color de la colonia en el reverso de la caja de Petri fue usado para agrupar aislamientos afines. Para los hongos con presencia de cuerpos cerrados se observó la morfología de la célula conidiógena (de pared paralela versus en forma de botella) y de los conidios para determinar el género.

Teleomorfos: en los hongos pertenecientes a Ascomycota, donde solamente aparecieron peritecios, se determinó la morfología de los ascos y ascosporas.

### **3.2. Bacterias**

Se registraron características morfológicas de las colonias en TSA tales como, tamaño, forma, bordes, superficie, consistencia y pigmentación.

## **4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

### **4.1. Extracción de ADN fúngico**

Para la extracción de ADN fúngico se siguió el protocolo descrito por Cenis (1992):

**i.** El cultivo se inició inoculando micelio de los hongos aislados en un microtubo con dextrosa de papa líquida y se dejó crecer durante 72 h a 25°C. Se centrifugó para luego eliminar el sobrenadante.

**ii.** Se adicionó solución tampón Tris/EDTA (20 mM de Tris HCl pH 8,5 y 25 mM de EDTA), se agitó, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante.

**iii.** Se añadió la solución tampón de extracción (20 mM de Tris HCl pH 8,5, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 0,5% SDS) y el micelio fue macerado. Luego se adicionó acetato de sodio 3M, pH 5,2 y se llevó a -20°C por 10 m. Se centrifugó y el sobrenadante fue transferido a otro microtubo.

**iv.** Se añadió un volumen de isopropanol, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El ADN fue precipitado por centrifugación y luego lavado con etanol 70% (sin

resuspender), se centrifugó 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar durante unos minutos en flujo de aire a 37°C y se resuspendió el ADN (pellet) en agua miliQ. La calidad y cantidad de ADN obtenido de cada cepa fue medida con espectrofotómetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) y luego se mantuvo congelado a -20°C.

#### 4.2. Extracción de ADN bacteriano

Para la preparación de ADN bacteriano, una vez crecidas las colonias puras, se colectó con un ansa una muestra de un cultivo puro en medio sólido de TSA y se realizó una purificación utilizando resinas (resina de intercambio catiónico, Sodio, 1% reticulado, 100-200 malla seca, 150-300 m de tamaño de grano húmedo, Chelex 100, BIO-RAD), siguiendo el protocolo descrito por Alippi y Aguilar (1998).

i. En un microtubo se resuspendió en NaCl 1 M y se agitó fuertemente para favorecer la homogenización. Se centrifugó para luego eliminar el sobrenadante.

ii. El pellet se lavó con agua bidestilada estéril, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante nuevamente.

iii. Se adicionó una suspensión acuosa (6% p/v) de resina en agitación. Se incubó 10 m a 58°C, y luego durante 8 m a 99°C.

#### 4.3. Caracterización de cepas fúngicas

Para la caracterización molecular de hongos se amplificó por PCR (reacción en cadena de polimerasa) parte del gen ITS 1, 5,8S e ITS2 (Internal Transcribed Sequences) del ARNr, fragmento interno de aproximadamente 300 a 600 pb, utilizando los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

ITS1F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron los siguientes:

REACTIVOS (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)
Tampón (10x)*	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,75
dNTPs (2 $\mu$ M)	2,5
Oligonucleotido ITS1 (10 $\mu$ M)	0,25
Oligonucleotido ITS4 (10 $\mu$ M)	0,25
Agua mili-Q estéril	17,55
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0,2
ADN molde (100-150 ng)	1

\*El tampón 10x contiene: 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl

La solución anterior se agitó en un vórtex antes de añadir el ADN molde. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo Maxygene Gradient (Axygen), utilizando las siguientes condiciones:

CONDICIONES		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización del ADN		95°C	3'
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	1'
	Hibridación	55°C	1'
	Extensión	72°C	1'
Extensión final		72°C	10'

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, usando como tampón TBE 0,5X (Tris-borato EDTA), pH 8,5 en una cubeta de 15 x 20 cm a 100V durante 20 m, utilizando el marcador de peso molecular  $\delta$  Eco RI Hind III. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en transiluminador con luz UV. Una vez comprobada la presencia de la banda correspondiente, se repitió la amplificación para cada caso y así lograr un volumen total de 100  $\mu$ l para su secuenciación.



### 4.3.1. Caracterización de cepas del género *Fusarium*

El género que se encontró en mayor cantidad en las plantas de yerba mate crecidas en condiciones a campo fue *Fusarium*. Estos aislamientos se agruparon por poseer características morfológicas y moleculares (ITS) del género. De los agrupamientos obtenidos en el árbol filogenético construido con las secuencias parciales de la región ITS1, 5,8S, ITS2, se seleccionaron representantes para analizar la secuencia del gen del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) del ARNr. Para ello se amplificó un fragmento de aproximadamente 700 pb, limitado por dos oligonucleótidos específicos ef1/ef2 (Geiser *et al.*, 2004).

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

ef1: 5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'

ef2: 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron los siguientes:

REACTIVOS (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)
Tampón (10x)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,625
dNTPs (2 $\mu$ M)	2,5
Oligonucleotido ef1 (10 $\mu$ M)	0,25
Oligonucleotido ef2 (10 $\mu$ M)	0,25
Agua mili-Q estéril	17,675
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0,2
ADN molde (100-150 ng)	1

La solución anterior se agitó en un vórtex antes de añadir el ADN molde. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador modelo Maxygene Gradient (Axygen), utilizando las siguientes condiciones:

CONDICIONES		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización del ADN		95°C	2'
35 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30''
	Hibridación	54 °C	30''
	Extensión	72 °C	45''
Extensión final		72 °C	2'

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, usando como tampón TBE 0,5X, utilizando el marcador de peso molecular  $\delta$  *Eco* RI *Hind* III. Una vez comprobada la presencia de la banda correspondiente, se repitió la amplificación para cada caso y así lograr un volumen total de 100  $\mu$ l.

#### 4.4. Caracterización de cepas bacterianas

##### 4.4.1. Caracterización de la diversidad de aislamientos bacterianos

Se evaluó la diversidad de los aislamientos a través de la amplificación de las regiones genómicas repetitivas: REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) utilizando los oligonucleótidos ERIC 1 y 2 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Versalovic *et al.*, 1991; 1994).

ERIC1: 5'- CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA -3'

ERIC2: 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG -3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla total y las concentraciones de los reactivos fueron los siguientes:

REACTIVOS (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)
Tampón (10x)	2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6
dNTPs (2 $\mu$ M)	2
Oligonucleotido ERIC1 (10 $\mu$ M)	1,5
Oligonucleotido ERIC2 (10 $\mu$ M)	1,5
Agua mili-Q estéril	11,2
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0,2
ADN molde (100-150 ng)	1

La solución anterior se agitó en un vórtex antes de añadir el ADN molde. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador Maxygene Gradient (Axygen), utilizando las siguientes condiciones:

CONDICIONES		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización del ADN		95°C	5'
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	1'
	Hibridación	45°C	1'
	Extensión	65°C	8'
Extensión final		68°C	16'

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, metafor (Cambrex MetaPhor™ Agarose) 0,5%, usando como tampón TBE 0,5 X, pH 8,5 en una cubeta de 15 x 20 cm a 70V durante 2 ½ horas, utilizando el marcador de peso molecular  $\delta$  Eco RI Hind III. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en transiluminador con luz UV. Los perfiles electroforéticos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Gelcompar version 4.0 (Applied Maths BVBA, Belgium). El dendrograma de similitud se construyó según el método de análisis de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para definir grupos distintos se consideró una similitud mayor de 75% entre los aislamientos. Para

la identificación de cepas con perfiles únicos y representativos de los grupos, se analizó una región del 16S del gen de ARNr.

#### 4.4.2. Caracterización de aislamientos bacterianos

La PCR para amplificar la región del 16S del gen de ARNr se realizó con los nucleótidos universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Cada reacción se llevó a cabo con un volumen total de 15  $\mu$ l. Los componentes de la mezcla fueron:

REACTIVOS (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR ( $\mu$ l)
Tampón (10x)	1,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,45
dNTPs (2 $\mu$ M)	1,5
Oligonucleotido fD1 (10 $\mu$ M)	0,75
Oligonucleotido rD1 (10 $\mu$ M)	0,75
Agua mili-Q estéril	8,9
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0,15
ADN molde (100-150 ng)	1

La solución anterior se agitó en un vórtex antes de añadir el ADN molde. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador Maxygene Gradient (Axygen), utilizando las siguientes condiciones:

CONDICIONES		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización del ADN		95°C	5'
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	1'
	Hibridación	55°C	1'
	Extensión	72°C	2'
Extensión final		72°C	10'

Se determinó la presencia de las bandas amplificadas por electroforesis en geles de agarosa 1%, utilizando el marcador de peso molecular  $\delta$  Eco RI Hind III. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en transiluminador con luz UV. En los casos que hubo presencia de bandas, se repitió las amplificaciones para lograr un volumen de 100  $\mu$ l de producto de PCR y así purificarlo.

#### 4.5. Purificación de los productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR de la región ITS1, 5,8S e ITS2 del ARNr y del gen EF-1 $\alpha$  (de hongos) se utilizó el Kit comercial AccuPrep Gel Purification (BIONEER). Se siguió el protocolo descrito por la marca comercial.

Para determinar la concentración de ADN necesario en los procedimientos de secuenciación, el ADN purificado se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando tampón TBE 0,5X a 70 V durante 20 minutos, utilizando el marcador de peso molecular  $\delta$  Eco RI Hind III.

Para la purificación de las amplificaciones del 16S del gen de ARNr de bacterias, se cortaron y purificaron las bandas obtenidas en la electroforesis ya que los primers utilizados pueden llegar a amplificar otras bandas. Se utilizó el Kit comercial PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit de Invitrogen, se siguió el protocolo descrito por la marca comercial.

#### 4.6. Secuenciación de los productos de PCR purificados

Las secuencias de los fragmentos del 16S del gen de ARNr purificadas fueron determinadas en Macrogen Corea Sequencing Superlab. Las secuencias de los productos de PCR de hongos

fueron determinadas por el servicio de secuenciación en el Instituto de Biotecnología, INTA Castelar.

#### 4.7. Análisis de secuencias

Las secuencias se compararon con secuencias ITS, EF-1 $\alpha$  (hongos) y 16S (bacterias) de ADN<sub>r</sub> disponibles en la base de datos pública de GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).) utilizando la herramienta de búsqueda de secuencias BLAST N.

Las secuencias fueron alineadas usando Clustal W del programa DNASTAR MegAlign (DNASTAR software, Lasergene, London), a partir del cual se construyó, además, una matriz de distancia de similitud entre secuencias.

Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). La reconstrucción filogenética se realizó utilizando el método de máxima similitud (ML) con 1000 réplicas de bootstrap usando la rutina incluida en el software MEGA. Para la construcción de los árboles de bacterias se utilizaron secuencias de 16S del gen de ARN<sub>r</sub> de *Streptomyces bicolor* (AB455534), *Tolypocladium* sp. (KF747329), *Microbacterium* sp. (KC853186) y *Bacillus* sp. (JX315323 y DQ448749) como grupos externos. Para hongos no fue necesario el uso de grupos externos debido a que se lograron grupos definidos con una elevada similitud entre las secuencias fúngicas obtenidas de yerba mate y las secuencias obtenidas del GenBank.

Las secuencias fueron depositadas en GenBank, del cual se obtuvieron números de accesiones.

### 5. ANÁLISIS DE FRECUENCIA Y DIVERSIDAD

La frecuencia de colonización (% CF) de hongos y bacterias en hojas y tallos fue calculada de acuerdo a Hata y Futai (1995) como:  $\% CF = (N_{col} / N_t) \times 100$ ; donde  $N_{col}$  = Número de segmentos colonizados por cada hongo y  $N_t$  = Total número de segmentos estudiados.

Para el análisis de la diversidad, se calcularon los índices de Shannon-Weaver (Bowman *et al.* 1971) y el índice de Simpson (Simpson, 1949) utilizando el software Past 3.01. Se compararon los índices de diversidad de hongos y bacterias entre clones, órganos y edad del tejido de la planta. Con los valores de índices se realizaron curvas de rarefacción que estima el número de especies esperadas en cada situación en función al número de muestras colectadas.

## 6. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Se inocularon plántulas de yerba mate cultivadas *in vitro* obtenidas de embriones con tres especies de *Fusarium*: *F. pseudocircinatum*, *F. oxysporum* y *F. verticilloide* caracterizados previamente por técnicas moleculares. El ensayo para cada inóculo se realizó en 3 repeticiones de 10 plántulas cada una. Luego de la inoculación, las plántulas fueron evaluadas semanalmente.

### 6.1. Preparación del inóculo e inoculación

Se usó la técnica descrita por Zum Felde *et al.* (2006). En cada caja de Petri con APG, conteniendo cultivos puros de *Fusarium pseudocircinatum*, *F. oxysporum* y *F. verticilloide*, se colocó 20 ml de agua destilada estéril y con una espátula se raspó suavemente la colonia. Cada una de las suspensiones se filtró a través de 3 gasas estériles y las suspensiones fueron recogidas en un vaso de precipitado estéril. Las concentraciones se ajustaron a  $1 \times 10^6$  conidios/ml, utilizando una cámara de Neubauer.

A cada plántula *in vitro* se le realizó con una aguja estéril se le realizó pequeñas heridas en el cuello del tallo donde se aplicó una suspensión de esporas de cada aislamiento de *Fusarium*, a razón de 0,5 ml/plántula. Las plántulas se incubaron en cámara de cultivo *in vitro* en condiciones controladas. Los síntomas fueron registrados semanalmente, utilizando la escala de severidad adaptada de La Mondia y Taylor (1987) (Fig. 1).

Valor de la escala	Síntomas	0	1	2	3	4
0	Planta saludable					
1	Planta descolorida					
2	Una hoja sintomática					
3	Más de una hoja sintomática					
4	Planta muerta					

**Figura 1:** Escala de severidad adaptada de La Mondia y Taylor (1987). Plántulas de yerba mate *in vitro* de cada nivel de la escala.

## 6.2. Detección del inóculo

Para determinar si el crecimiento de cada hongo se produjo en el tejido interno y/o externo, se realizaron cortes que fueron observados por microscopio electrónico de barrido (MEB, JEOL 2800 LV). Luego de la cuarta semana de inoculación, las plántulas *in vitro* de yerba mate fueron fijadas en FAA (formaldehído al 37%, ácido acético), y luego las muestras deshidratadas a través de una serie de acetona graduada. Subsecuentemente las muestras fueron deshidratadas a punto crítico usando CO<sub>2</sub> líquido como fluido de transición, recubierto de oro – paladio en un revestidor de bombardeo iónico y, finalmente observadas en microscopio electrónico de barrido LV JEOL 5800 (SEM).

## 6.3. Reaislamiento del inóculo

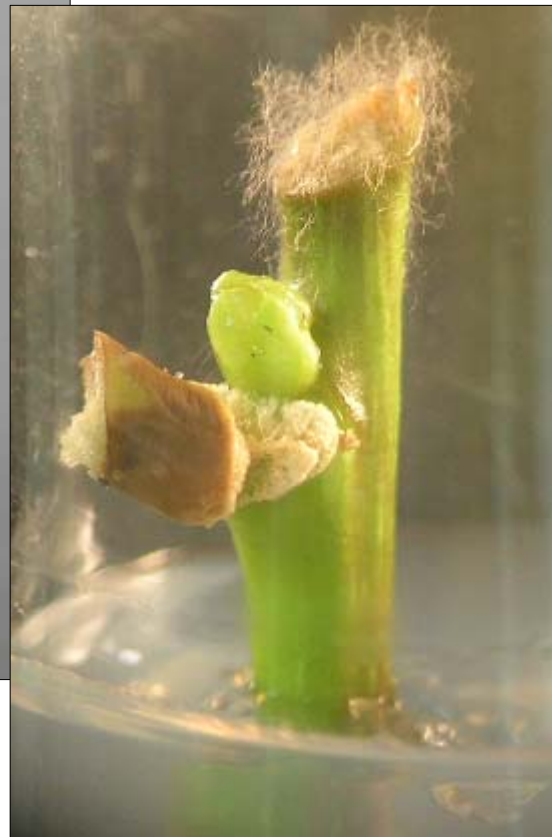
Una vez realizada la última observación (4ta semana), se procedió a re-aislar los tres inóculos. En una cabina de flujo laminar, se tomaron 5 tubos con plántulas inoculadas de cada especie de *Fusarium*, con una aguja estéril se tomó micelio con parte de tejido vegetal, se sembró en cajas de Petri con APG y se conservaron en estufa 27°C con alternancia de 12 horas luz/oscuridad. Luego de 10 días los inóculos fueron caracterizados morfológicamente.



## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### CONTAMINANTES DEL CULTIVO *IN VITRO* DE YERBA MATE. HONGOS Y BACTERIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS EN INVERNADERO



## HONGOS Y BACTERIAS AISLADOS DEL CULTIVO *IN VITRO* Y PLANTAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO DE YERBA MATE

Para conocer la población y origen de contaminantes en el cultivo *in vitro* de yerba mate se aislaron microorganismos a partir de cultivos de segmentos nodales de dos clones (SI-49 y 67) y se muestrearon tallos y hojas jóvenes y adultas de los mismos clones de plantas en condiciones de invernadero.

### 1. Caracterización morfológica de hongos

Se caracterizaron 5 géneros de hongos *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Setophoma* de cultivo *in vitro* y de plantas yerba mate en condiciones de invernadero, y *Alternaria* sólo se aisló de cultivo *in vitro*.

*Alternaria*: se identificaron 4 aislamientos del cultivo *in vitro*. Colonias con color entre oliváceo a negro. A microscopio se observaron conidióforos pardo a pardo oscuro. Conidios en cadena o solitarios, con rostro, y septas transversales, longitudinales y oblicuas.

*Curvularia*: se identificaron 7 aislamientos entre los de cultivo *in vitro* e invernadero. Se observaron conidióforos oscuros, septados y simples, conidios oscuros con varias septas, unilateralmente curvados y con la célula central más pigmentada que las otras.

*Fusarium*: se identificaron 12 aislamientos entre los de cultivo *in vitro* y plantas de invernadero. Al microscopio se observaron las estructuras de esporulación principalmente tipo de célula conidiógena (mono versus polifialídica), micro, meso y macroconidios fusiformes y clamidosporas.

*Penicillium*: 6 aislamientos. El color de las colonias en APG fue verdoso, se pudo observar conidióforos derivados del micelio, en grupos, con conidios hialinos, globosos y en cadena.

*Setophoma*: 4 aislamientos que sólo fueron identificados con técnicas moleculares.

## 2. Caracterización molecular de hongos y análisis filogenético

Un total de 42 aislamientos de hongos, de cultivos *in vitro* y plantas de invernadero, fueron caracterizados a nivel de género mediante análisis de secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr. Dichas secuencias fueron previamente comparadas con la base de datos del Genbank por BlastN (Tabla 1).

El árbol filogenético (Fig. 2) construido utilizando los datos de secuencias demostraron que las cepas se distribuyeron en tres órdenes: Eurotiales, Hypocreales y Pleosporales.

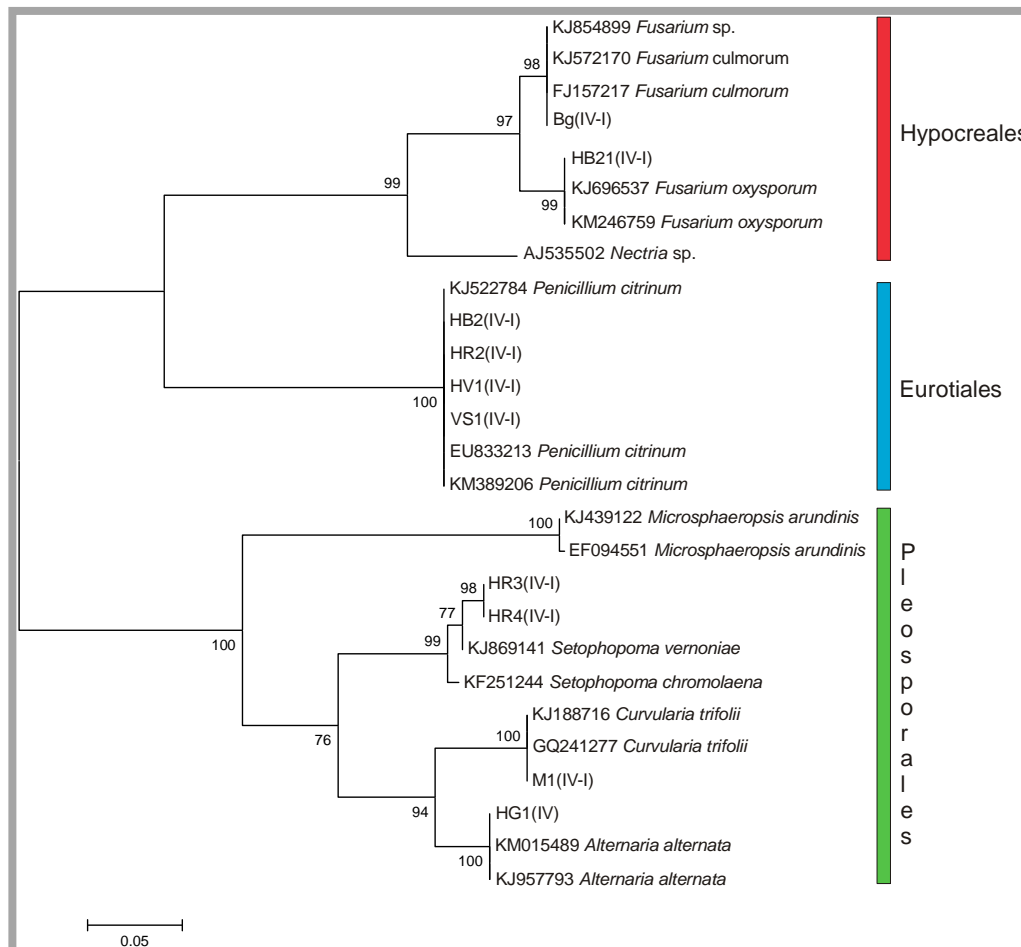
Hypocreales: representó el 38,1% (16) del total de aislamientos. El total correspondió al 100% de *Fusarium*. De acuerdo con el árbol filogenético basado en secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr se formaron 2 grupos, 6 aislamientos representados por Bg1 asociados a *F. culmorum* y 10 aislamientos representados por HB21 asociado a *F. oxysporum* (Fig. 2).

Eurotiales: representaron el 19,1% del total de aislamientos de hongos. Todos los aislamientos se agruparon con *Penicillium citrinum* (Fig. 2).

Pleosporales: representó 42,8% de los aislamientos (18) y se relacionaron a tres géneros, *Alternaria*, *Curvularia* y *Setophoma*. HG1 que representó a cinco aislamientos de cultivo *in vitro* se asoció a *Alternaria alternata*. M1 representó a otros siete aislamientos y se asoció a *Curvularia trifolii*. HR4 representó a 6 aislamientos y se asoció con *Setophoma vernoniae* y *S. chromolaena* (Fig. 2).

**Tabla 1:** Hongos caracterizados en plantas de invernadero y de cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) con la accesión más cercana basadas en el análisis de BLAST (Genbank).

Nombre del aislamiento	Nº de aislamientos	Fuente	Nº Accesión de GenBank	Género o especie relacionada	% Similitud
Bg1	6	Tallo y hoja (invernadero) <i>In vitro</i>	FJ157217	<i>Fusarium culmorum</i>	100%
HB21	10	Tallo y hoja (invernadero) <i>In vitro</i>	KJ696537	<i>Fusarium oxysporum</i>	99%
VS1	8	Hoja-Tallo (invernadero) <i>In vitro</i>	EU833213	<i>Penicillium citrinum</i>	100%
HR4	6	Hoja (invernadero) <i>In vitro</i>	KF251244	<i>Setophoma chromolaena</i>	100%
M1	7	Tallo (invernadero) <i>In vitro</i>	GQ241277	<i>Curvularia trifolii</i>	99%
HG1	5	<i>In vitro</i>	KM015489	<i>Alternaria alternata</i>	100%



**Figura 2:** Árbol filogenético de secuencias ITS de aislamientos de hongos aislados de cultivo *in vitro* y hongos endofíticos de plantas crecidas en invernadero y especies de referencia de Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap).

IV: aislado de cultivo *in vitro*; I: aislado de invernadero.

### 3. Caracterización molecular de bacterias y análisis filogenético

Los géneros de bacterias caracterizados fueron 5, *Pantoea* y *Staphylococcus* tanto de cultivo *in vitro* como de plantas de invernadero, *Acinetobacter*, *Janibacter* del cultivo *in vitro* y *Bacillus* aislada sólo de plantas de invernadero.

Un total de 20 aislamientos de bacterias, provenientes de plantas de invernadero y cultivo *in vitro*, fueron caracterizados mediante análisis de secuencia de 16S ADNr. Dichas secuencias fueron previamente comparadas con la base de datos del Genbank por BlastN y reveló que las bacterias aisladas pertenecieron a las clases Actinobacterias,  $\gamma$  Proteobacterias y Firmicutes, incluyendo 5 géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Janibacter*, *Pantoea* y *Staphylococcus* (Tabla 2), también agrupados al construir el árbol filogenético (Fig. 3).

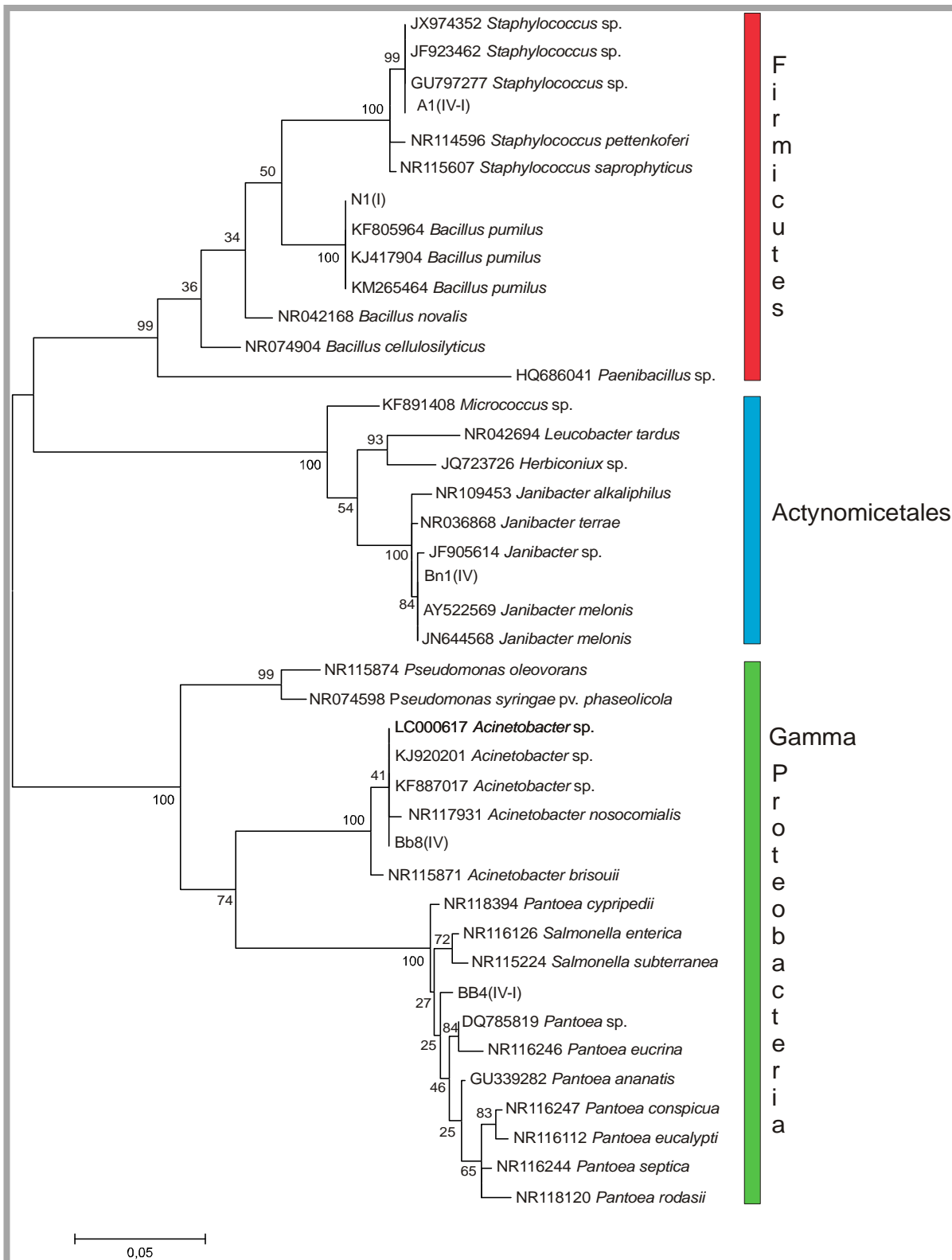
Firmicutes: representó el 43% de los aislamientos. Comprendió los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus*. El aislamiento A1 representó a otros 4 aislamientos provenientes de cultivo *in vitro* y plantas de invernadero y se asoció con *Staphylococcus*. N1 representó sólo aislamientos de plantas de invernadero y se relacionó a *Bacillus pumilus* (valor de similaridad de BLAST 100%).

Actinomycetales: correspondió a la menor proporción de aislamientos (5%), fue proveniente de cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate y se asoció a *Janibacter melonis* (BN1).

$\gamma$ Proteobacteria: estuvo representado por el mayor número de aislamientos bacterianos y representó el 52% del total, se asociaron a *Pantoea* aislado de ambas fuentes y *Acinetobacter* solo aislado de cultivo *in vitro*. BB4 se asoció con *Pantoea cyripedii* (el valor de similitud de BLAST fue 100%), y el BB8 se relacionó con *Acinetobacter* sp. (el valor de similitud de BLAST fue 100%).

**Tabla 2:** Bacterias caracterizadas en plantas de invernadero y de cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) con la accesión más cercana basadas en el análisis de BLAST (Genbank).

Nombre del aislamiento	Nº de aislamientos	Fuente	Nº Accesión de Genbank	Género o especie relacionada	% Similitud
A1	4	Tallo (invernadero) <i>In vitro</i>	KF475819	<i>Staphylococcus</i> sp.	100%
BN1	1	<i>In vitro</i>	AY522569	<i>Janibacter melonis</i>	99%
BB4	7	Hoja-Tallo (invernadero) <i>In vitro</i>	NR118394	<i>Pantoea cypripedii</i>	99%
BB8	3	<i>In vitro</i>	KF887017	<i>Acinetobacter</i> sp.	99%
N1	5	Hoja-Tallo (invernadero) <i>In vitro</i>	KF805964	<i>Bacillus pumilus</i>	99%

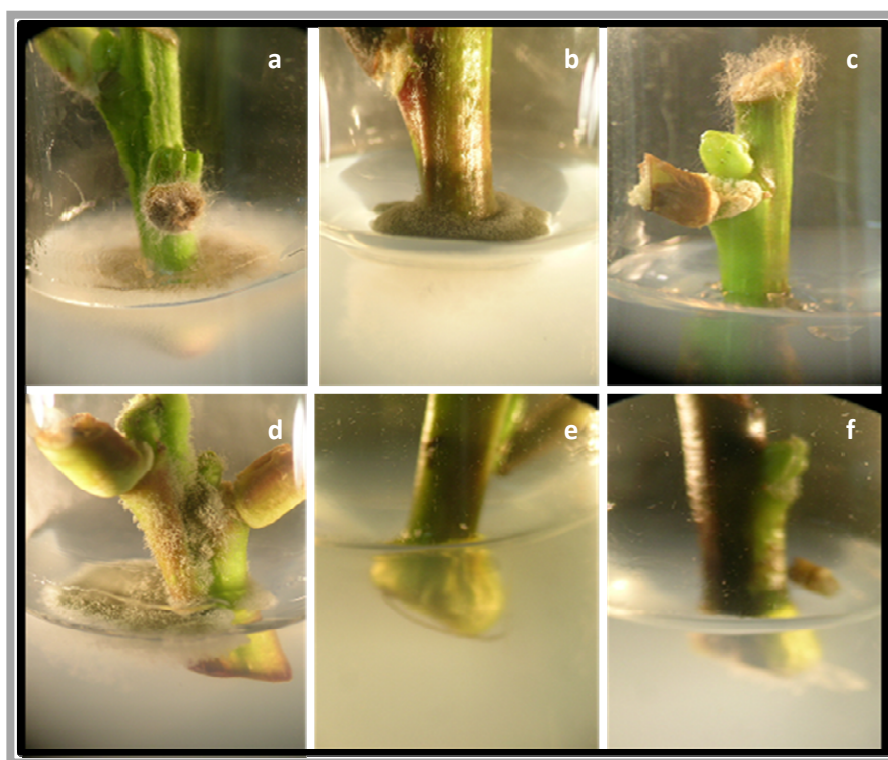


**Figura 3:** Árbol filogenético de secuencias 16S del gen ARNr de aislamientos de bacterias aisladas de cultivo *in vitro* y bacterias endofíticas de plantas crecidas en invernadero y especies de referencia provenientes del Genbank construido por ML (1000 réplicas de bootstrap). IV: aislado de cultivo *in vitro*; I: aislado de invernadero

#### 4. Contaminantes en cultivo *in vitro*

La contaminación en cultivo *in vitro* se evaluó en 10 tubos/clon (clones SI49 y 67) con tres repeticiones (Fig. 4). A partir de los 15 días de cultivados los segmentos nodales, se procedió al aislamiento de hongos y bacterias.

Los segmentos nodales cultivados *in vitro* presentaron una contaminación de 75 % en el clon SI49 y 80% en el clon 67 (Tabla 3).



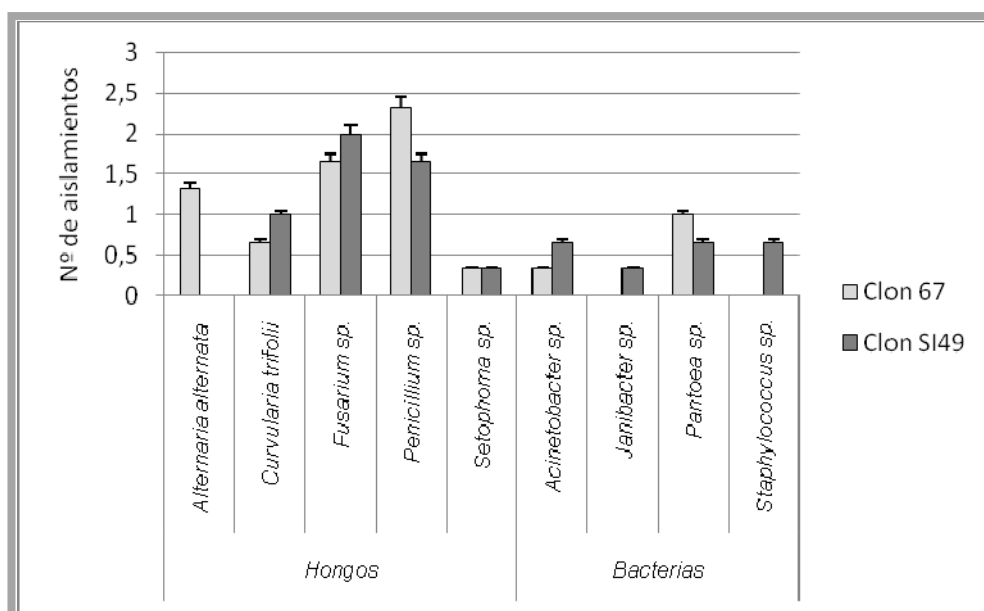
**Figura 4:** Contaminación de hongos (a, b, c, d) y bacterias (e, f) en cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate.



**Tabla 3:** Porcentaje de tubos contaminados con hongos y bacterias en cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate. Se presentan las medias  $\pm$  desvío estándar.

CLON	% tubos Contaminados			
	Contaminación por hongos	Contaminación por bacterias	Contaminación por hongos y bacterias	% Total contaminados
SI49	45 $\pm$ 5	25 $\pm$ 5	5 $\pm$ 0	75
67	60 $\pm$ 10	15 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	80

En ambos clones la proporción de hongos fue mayor que de bacterias, con un total de 33 aislamientos de hongos y 11 de bacterias. Se caracterizaron 5 hongos de los géneros: *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Setophoma*, y cuatro bacterias de los géneros: *Acinetobacter*, *Janibacter*, *Pantoea* y *Staphylococcus*. En cuanto a los clones, si bien no hubo diferencias entre el número de aislamientos, se diferenciaron en un género de hongo y uno de bacteria. *Alternaria* fue el género fúngico aislado únicamente del clon 67, y *Janibacter* el género de bacteria que se aisló sólo del clon SI49. Los demás géneros de hongos y bacterias estuvieron presentes en ambos clones (Fig. 5).

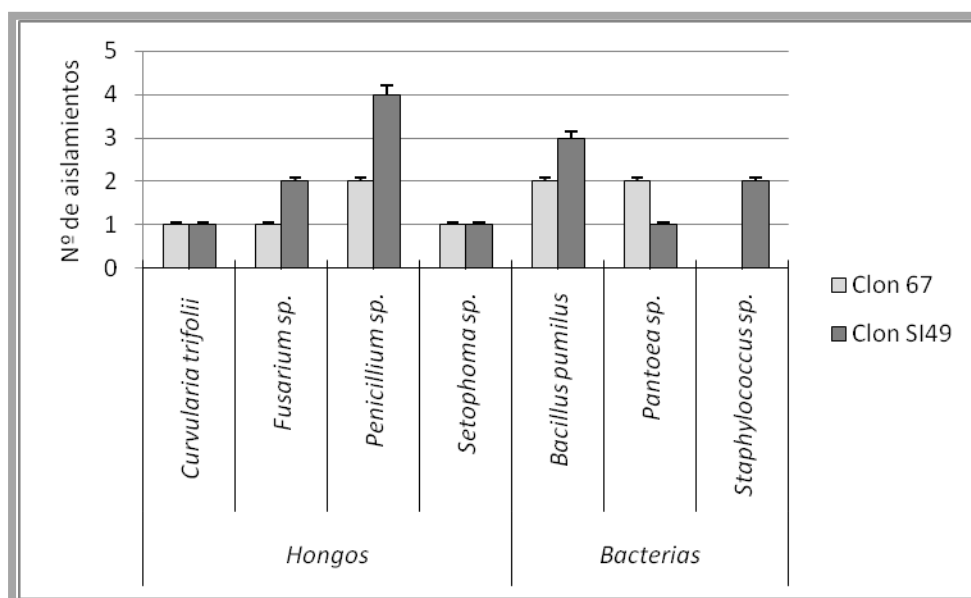


**Figura 5:** Número de aislamientos promedio de hongos y bacterias contaminantes del cultivo *in vitro* de segmentos nodales de yerba mate. Las barras representan el desvío estándar.

## 5. Población endofítica de plantas en condiciones de invernadero

Para la determinación del posible origen de los contaminantes del cultivo *in vitro*, se procedió al aislamiento de hongos y bacterias endofíticos de plantas crecidas en invernadero. Para ello se realizó un muestreo, en el mes de Junio, al mismo momento que se realizó la introducción del material *in vitro*, de tallos y hojas de plantas aparentemente sanas de yerba mate de dos clones (SI49 y 67).

En los muestreos realizados de plantas de invernadero se aislaron 13 hongos y 10 bacterias, de los cuales se identificaron 4 hongos de los géneros: *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Setophoma* y 3 bacterias: *Bacillus pumilus*, *Pantoea* y *Staphylococcus epidermidis*. Los cuatro géneros de hongos estuvieron presentes en ambos clones, mientras que de las bacterias, *Staphylococcus epidermidis* sólo se aisló del clon SI49 (Fig. 6).

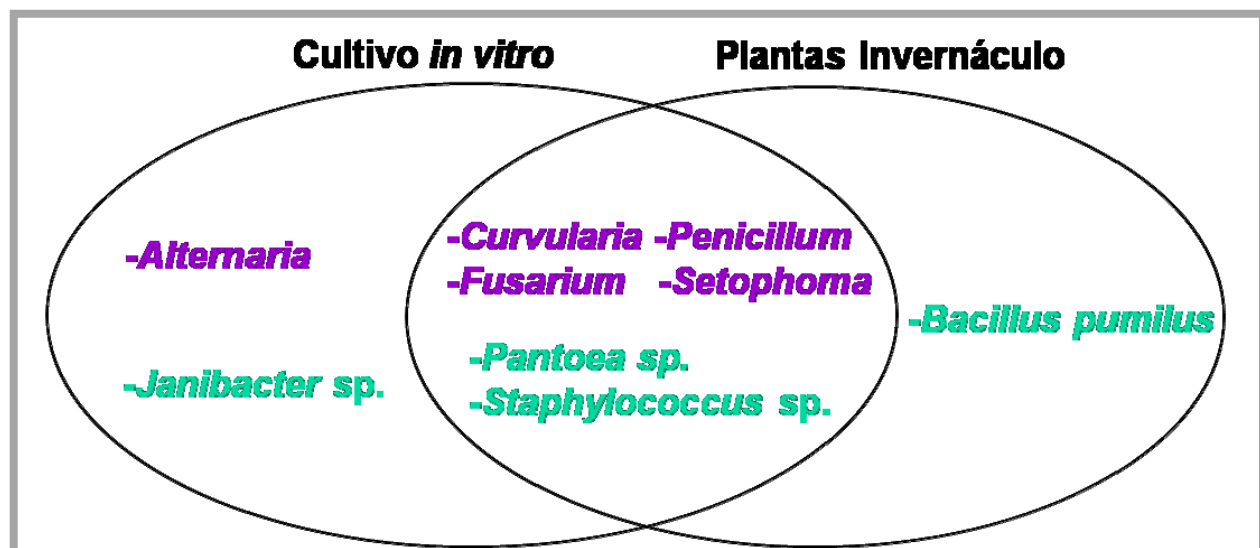


**Figura 6:** Número de aislamientos promedio de hongos y bacterias endofíticos de dos clones (67 y SI49) de plantas de yerba mate en condiciones de invernadero. Las barras representan el desvío estándar.

## 6. Microorganismos contaminantes en el cultivo *in vitro* y endofíticos de plantas en condiciones de invernadero de yerba mate

Los géneros de hongos que se aislaron tanto de cultivo *in vitro* como de invernadero fueron *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Setophoma*. *Alternaria* fue el único contaminante en los cultivos *in vitro*.

Las bacterias comunes presentes aisladas en cultivos *in vitro* y plantas de invernadero, fueron *Pantoea* sp. y *Staphylococcus* sp.. Sólo se aisló *Janibacter* sp. de cultivos *in vitro* y *Bacillus pumilus* de plantas de invernadero (Fig. 7).

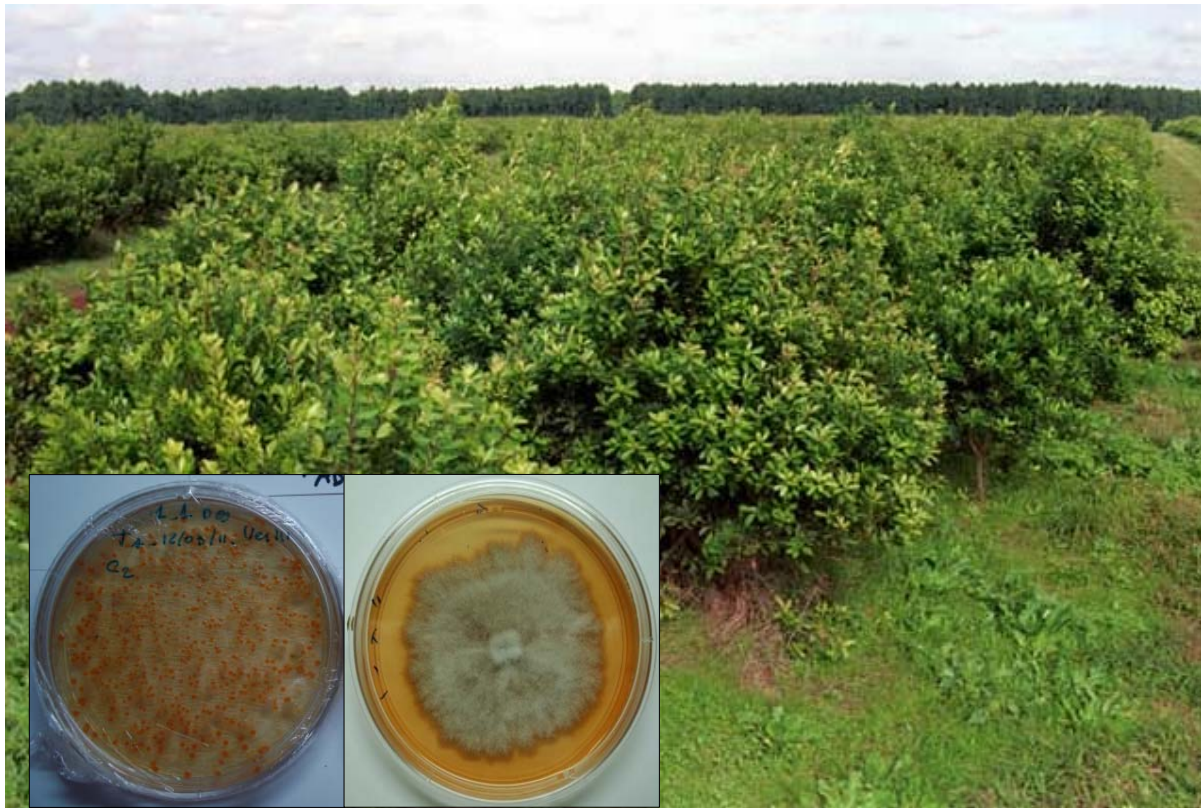


**Figura 7:** Hongos (letra violeta) y bacterias (letra verde) aislados de cultivo *in vitro* y de plantas de invernadero o de ambos en yerba mate.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### HONGOS Y BACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE PLANTAS DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)



## HONGOS Y BACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE PLANTAS DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis*)

Para conocer la población de microorganismos endofíticos que habitan en plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en condiciones de campo y su variación en las distintas épocas del año, se muestrearon hojas y tallos jóvenes y adultos de tres clones (SI-49, LM, G18). Se realizaron 6 muestreos en diferentes fechas, Junio, Octubre y Diciembre del año 2010, Junio, Agosto y Diciembre del año 2011. De un total de 216 muestras vegetales fueron obtenidos 242 aislamientos de hongos y 322 aislamientos de bacterias. Una visualización conjunta de los aislamientos obtenidos sirvió para agrupar cultivos morfológicamente similares. Como resultado de esta preselección fueron procesados y caracterizados un total de 162 aislamientos fúngicos y 193 aislamientos bacterianos.

### 1. Caracterización de aislamientos

En total, 156 aislamientos fúngicos fueron identificados mediante caracteres morfológicos y/o moleculares, además de otros 6 hongos identificados a nivel de especie por medio de caracteres morfológicos, siendo 162 el total de aislamientos de endófitos identificados en plantas de yerba mate. Los aislamientos fúngicos fueron asociados con 14 géneros *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gliocladium* (*Bionectria*), *Guignardia* (*Phyllosticta*), *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phomopsis* (*Diaporthe*) y *Trichoderma*.

El total de aislamientos bacterianos fue 193, luego de ser caracterizados culturalmente y por sus perfiles electroforéticos el número aislamientos para su secuenciación se redujo a 98. Los aislamientos bacterianos caracterizados por análisis de secuencia del 16S del gen de ADNr se asociaron a 20 géneros. Los géneros fueron *Aeromicrobium*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Curtobacterium*, *Herbiconiux*, *Kineococcus*, *Leucobacter*, *Lysinibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Phenylobacterium*, *Rhizobium*, *Roseomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* y *Xylophilus*.

## 1.1. Identificación morfológica de hongos

El 66,5% de los aislamientos fúngicos esporularon en APG y se utilizaron los caracteres morfológicos para su identificación, mientras que los aislamientos miceliares que no habían esporulado en APG fueron sembrados en medios de cultivo alternativos como SNA o CMA con tallo de soja estéril para su esporulación. Los caracteres moleculares, secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr, sirvieron para contrastar la identificación morfológica de los cultivos esporulados, y para identificar los aislamientos. En todos los casos la identificación morfológica y molecular coincidió en la identidad de los aislamientos. Se caracterizaron morfológicamente 10 géneros. Los 4 géneros restantes (*Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora* y *Paecilomyces*) no esporularon por lo que no fue posible su caracterización morfológica.

-*Fusarium*: se identificaron 102 aislamientos. Los colores de colonias crecidas en APG, variaron de blanco, rosado claro, rosa oscuro y púrpura. Al microscopio, se observaron estructuras de esporulación principalmente células conidiógenas (mono versus polifialídica), micro, meso y macroconidios fusiformes y clamidosporas. Dos aislamientos transferidos a SNA, se identificaron a nivel de especie como *F. solani* (monofialídico) y su estado teleomorfo, *Nectria haematococca* por la morfología de los ascos y ascosporas (Fig. 8.A).

-*Phomopsis*: Se caracterizaron 8 aislamientos. La coloración de las colonias en APG fue predominantemente gamuza y algunas negras. Se desarrollaron picnidios oscuros de pico corto que presentaron células conidiógenas angostas con paredes casi paralelas y 2 tipos de conidios (alfa y beta) en 2 de los aislamientos, y solo beta en 6 aislamientos. Tres cultivos crecidos en CMA-tallo de soja produjeron, sobre el mismo tallo de soja las formas anamorfa y teleomorfa. En los cultivos el estado anamorfo *Phomopsis* se caracterizó por los picnidios de pico corto con beta conidios y en el mismo tallo de soja peritecios de pico largo con ascos y ascosporas de *Diaporthe* (Fig. 8.B).

-*Colletotrichum*: se identificaron 6 aislamientos, crecidos en APG, variando su color de blanco a gris, con conidiomas tipo acérvulas oscuras, con largas setas oscuras y conidios hialinos ovoides y unicelulares (Fig. 8.C).

-*Aspergillus*: se identificaron 2 aislamientos. El color de las colonias en APG fue ocre oscuro. Se observaron conidióforos simples con vesícula terminal globosa y conidios globosos, hialinos y en cadena (Fig. 8. D).

-*Penicillium*: incluyó a 6 aislamientos. El color de las colonias en APG fue verdoso, se pudo observar conidióforos derivados del micelio, en grupos, con conidios hialinos, globosos y en cadenas (Fig. 8.E).

-*Gliocladium roseum*: correspondió a 5 aislamientos, los que fueron identificados morfológicamente y a nivel de especie por la presencia de los estados anamorfos y teleomorfos en 2 medios de cultivo. En APG, y microscopio estereoscópico se observó la presencia de conidióforos agrupados tipo “cepillo” y gotas mucilaginosas. Al microscopio óptico se verificaron los conidióforos en ramas peniciliados y conidios (unicelulares) ambos hialinos. Un aislamiento crecido tanto en CMA-tallo soja como en el cultivo original en APG, produjo la forma sexual *Bionectria ochroleuca* (Fig. 8. F).

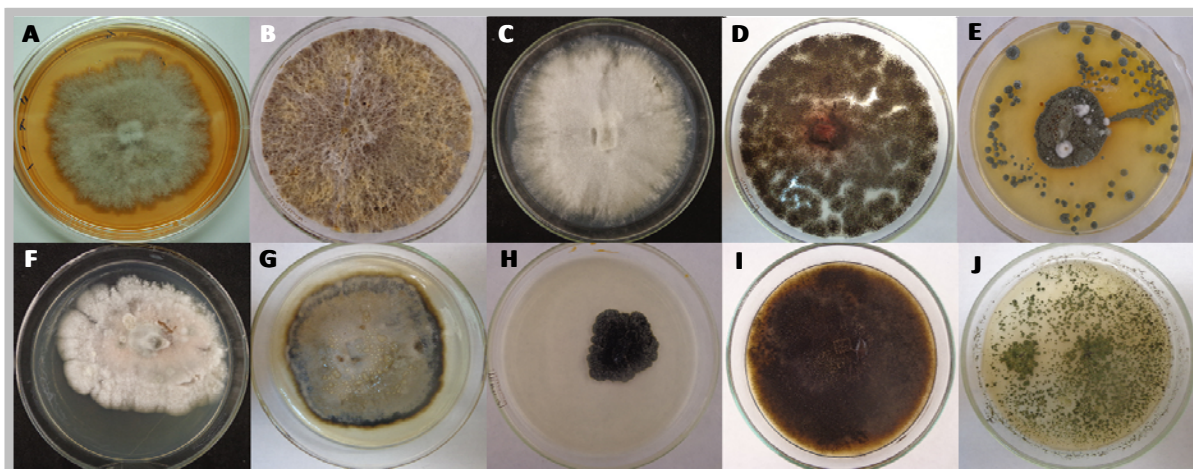
-*Cercospora*: se identificaron 5 aislamientos. Morfológicamente las colonias fueron grisáceas. Conidióforos pardos, conidios solitarios, obclavados, hialinos, rectos o curvados y pluriseptados (Fig. 8.G).

-*Phyllosticta*: correspondió a 2 aislamientos. Se observaron picnidios oscuros y globosos, conidióforos cortos y conidios unicelulares hialinos y ovoides (Fig. 8.H).

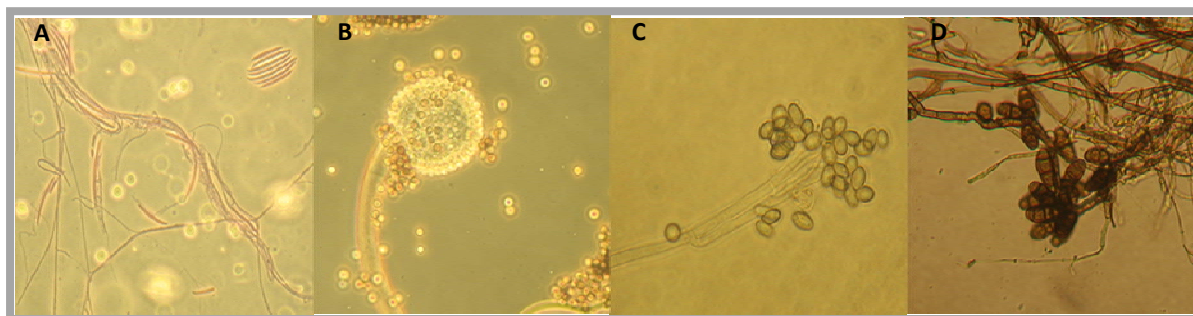
-*Curvularia*: se identificaron 2 aislamientos. Se observaron conidióforos oscuros, septados y simples, conidios oscuros con varias septas, unilateralmente curvados y con la célula central más pigmentada que las otras (Fig. 8.I).

-*Trichoderma*: Se identificaron 2 aislamientos. En APG las colonias fueron de color verdoso. Se observaron conidióforos y conidios hialinos, ambos en grupo, los conidios unicelulares y ovoides (Fig. 8. J).





**Figura 8:** Cultivos en APG de géneros de hongos endofíticos aislados de yerba mate caracterizados morfológicamente. A. *Fusarium*, B. *Phomopsis*, C. *Colletotrichum*, D. *Aspergillus*, E. *Penicillium*, F. *Gliocladium*, G. *Cercospora*, H. *Phyllosticta*, I. *Curvularia*. J. *Trichoderma*



**Figura 9:** Algunos géneros endofíticos aislados de yerba mate A. hifas y macroconidios de *Fusarium*, B. conidióforo y conidios de *Aspergillus*, C. Hifas, conidióforo y conidios de *Penicillium*, D. micelio y conidios de *Curvularia*

## 1.2. Caracterización molecular de hongos y análisis filogenético

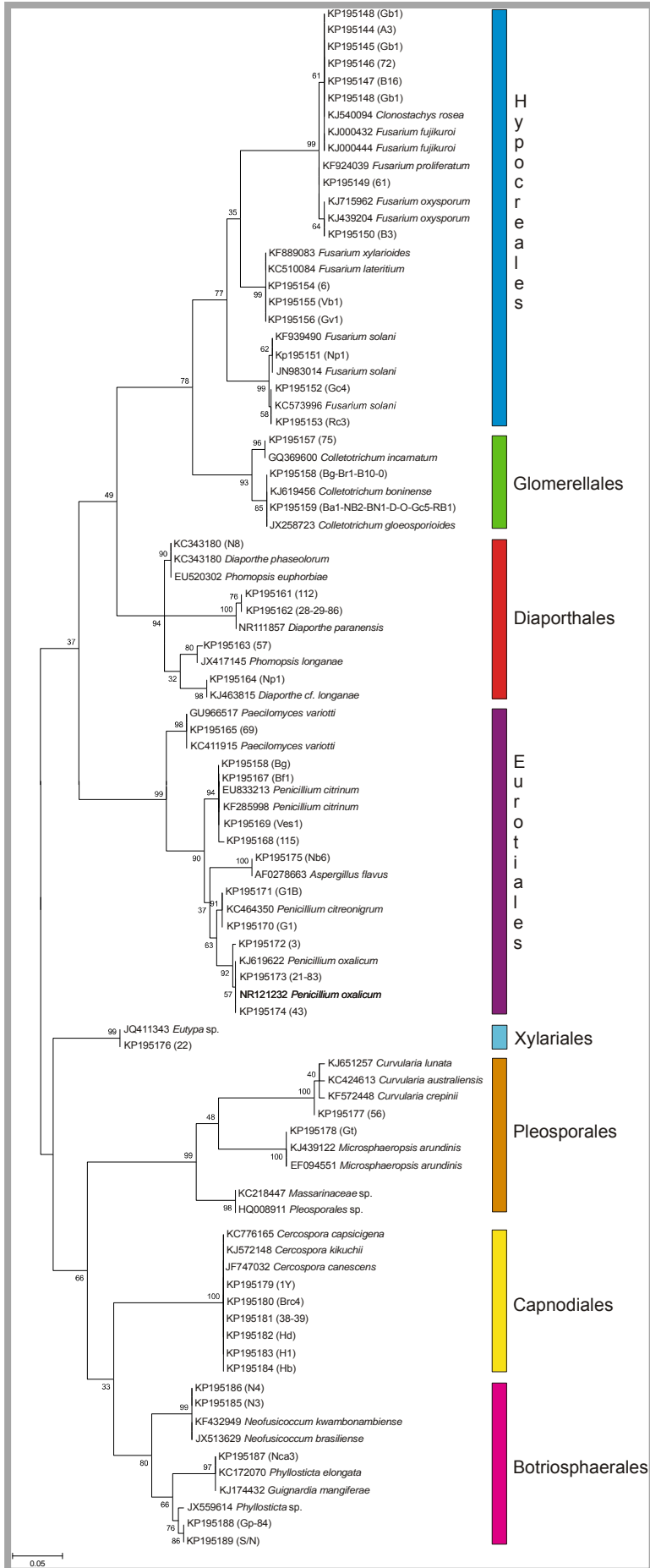
El análisis de la secuencias de los genes permitió caracterizar y clasificar taxonómicamente las especies de hongos endofíticos aislados de plantas de yerba mate. Con el alineamiento múltiple de las secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr obtenidas se construyó una matriz de similitud y se generó un dendrograma con el método de ML con valores de bootstrap de 1.000 réplicas



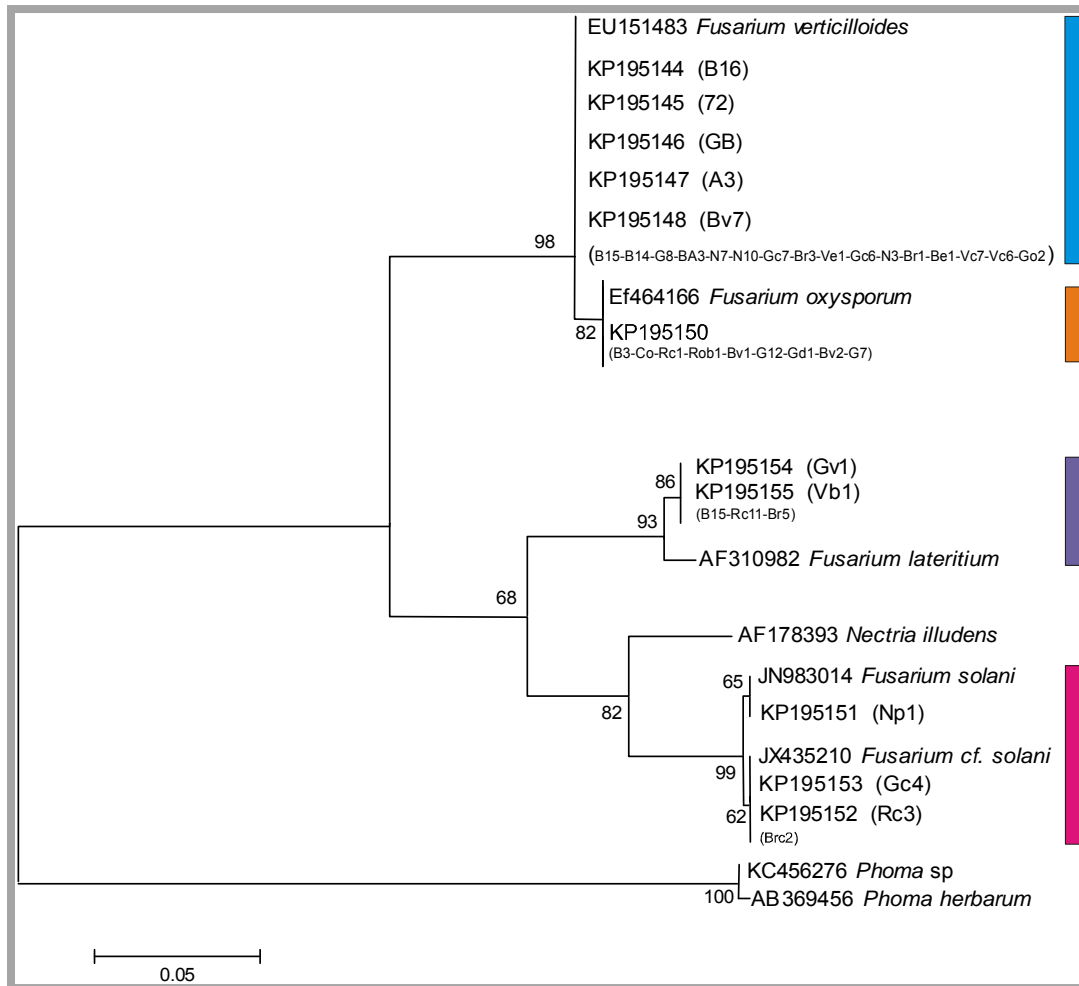
usando el software MEGA.5.2. (Tamura *et al.*, 2011). Los aislamientos cuyas secuencias eran similares en más de 97% fueron agrupados y de ellos se seleccionó un aislamiento representante que fue utilizado para la construcción del árbol filogenético con el método de ML. El árbol reveló que todos los hongos endofíticos pertenecieron al phylum Ascomycota, incluyendo 12 géneros *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium* (*Nectria*), *Guignardia* (*Phyllosticta*), *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phomopsis* (*Diaporthe*). Estos géneros se distribuyeron en ocho órdenes: Hypocreales, Glomerellales y Diaporthales (Sordariomycetidae), Eurotiales (Eurotiomycetidae), Capnodiales (Mycosphaerellaceae), Pleosporales (sedis incertae), Botryosphaerales (Dothidiomycetidae) y Xylariales (Diatrypaceae) (Fig. 10).

Hypocreales: 102 aislamientos fúngicos pertenecieron a este orden lo que representó un 57,7% del total de aislamientos. Todos los aislamientos de este orden correspondieron al género *Fusarium*. De acuerdo con el árbol filogenético basado en secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr (Fig. 10), se formaron 5 diferentes grupos, el primer grupo de 6 aislamientos (GB1, B16, 72, GB, A3, BV7) se asoció a *F. fujikuroi*. El segundo grupo de dos aislamientos (61 y B3) se asoció a *F. proliferatum* y a *F. oxysporum* respectivamente. Dos grupos de tres aislamientos cada uno (un grupo con los aislamientos Np1, Rc3 y Gc4, y el otro grupo con Gv1, VB1 y 6) se asociaron a *F. solani* el primer grupo y a *F. lateritium* y *F. xylarioide* el segundo grupo.

La caracterización a nivel de especie de *Fusarium* se llevó a cabo seleccionando 29 aislamientos del árbol filogenético basado en las secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr (Fig. 11). Los aislamientos seleccionados fueron analizados a partir de las secuencias del EF-1 $\alpha$  del ARNr, estas fueron alineadas y luego se construyó la matriz de similitud de los aislamientos. Los aislamientos cuyas secuencias eran similares en más de 97% fueron considerados de la misma especie, de ellas se seleccionó un aislamiento representante que fue utilizado para la construcción del árbol filogenético, se formó con 5 aislamientos representativos (Tabla 4), estos fueron asociados a 5 especies, *F. pseudocircinatum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. lateritium* y *F. solani* (Fig. 12).



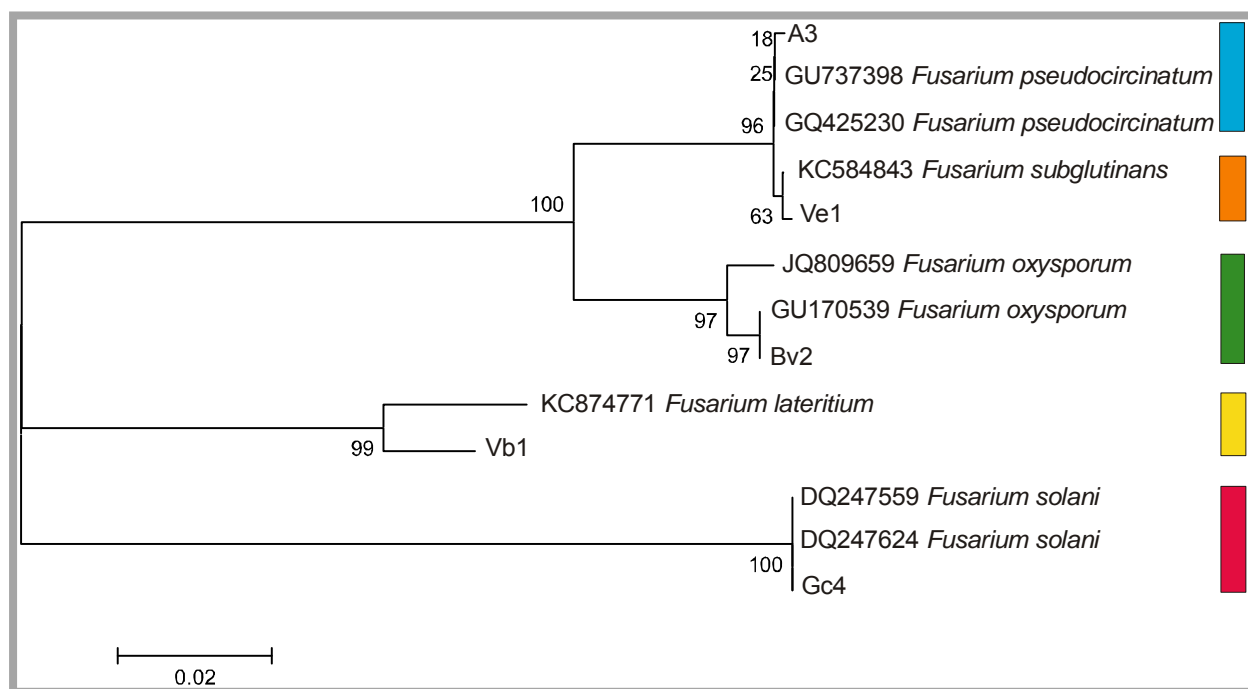
**Figura 10:** Árbol filogenético mostrando la relación de las secuencias parciales representativas de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de aislamientos de hongos endofíticos de yerba mate y aislamientos de referencia provenientes del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap).



**Figura 11:** Árbol filogenético basado en secuencias parciales de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de hongos endofíticos (registradas en Genbank) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap). Barras de colores indican diferentes especies *Fusarium*.

**Tabla 4:** Especies de *Fusarium* endofíticas aisladas de plantas de yerba mate y sus similitudes con accesiones extraídas de Genbank.

Cepa representativa de <i>Fusarium</i>	Nº aislamientos	Nº de accesión de GenBank	Especie de <i>Fusarium</i>	Máxima similitud
Bv2	23	JQ809659 GU170539	<i>F. oxysporum</i>	96,9%
A3	15	GU737398	<i>F. pseudocircinatum</i>	99,8%
Vb1	12	KC874771	<i>F. lateritium</i>	93,6%
Ve1	11	KC584843	<i>F. subglutinans</i>	99,2%
Gc4	4	DQ247624 DQ247559	<i>F. solani</i>	99,4%



**Figura 12:** Árbol filogenético mostrando la relación de las secuencias representativas del EF-α1 de aislamientos de *Fusarium* endofíticos de yerba mate y secuencias de aislamientos disponibles en el Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap). Barras de colores indican diferentes especies de *Fusarium*.

El orden que le sigue a Hypocreales en cuanto a número de aislamientos fue Glomerellales.

Glomerellales: representado por el género *Colletotrichum* con 14 aislamientos. El análisis filogenético reveló que el aislamiento 75 se asoció con *C. incarnatum*, mientras que 13 aislamientos (BG, Br1, B10, 0, BA1, NB2, BN1, D, O, Gc5, RB1, A y Vp1) se asociaron con *C. boninense* y *C. gloesporioides* (Fig. 10).

Diaporthales: correspondieron al género *Phomopsis/Diaporthe* y representaron el 6,4% de los aislamientos fúngicos. En el árbol filogenético, los aislamientos fueron separados en cuatro grupos, el primer grupo de un aislamiento (N8) se asoció con *D. phaseolorum* y *P. euphorbiae*, el grupo siguiente de 4 aislamientos (112-28-29 y 86) se relacionó con *D. paranensis*, y los aislamientos 51 y Np1 se asociaron con *P. longanae* y con *D. cf. Heveae* respectivamente. (Fig. 10).

Eurotiales: fue el segundo orden representado por la mayor cantidad de aislamientos (20 aislamientos, 12,8%), de los cuales 16 aislamientos fueron caracterizados como *Penicillium*, dos aislamientos como *Aspergillus* y dos a *Paecilomyces*. Dentro del género *Penicillium*, cuatro cepas (Bg, Bf1, Bes1 y 115) mostraron estar estrechamente relacionados con *P. citrinum*, 2 cepas (G1B y G1) con *P. citreonigrum* y tres cepas (21, 83 y 43) se agruparon con *P. oxalicum*. Los aislamientos NB6 y 69 se asociaron con *Aspergillus flavus* y *Paecilomyces variotti* respectivamente.

Capnodiales: fue representado por 6 aislamientos, representando el 4,5% del total, (1y, Brc4, 38/9, Hd, H1 y Hb), los cuales se asociaron a tres especies *Cercospora capsicigena*, *C. kikuchii* y *C. caenescens*.

Botryosphaerales: representado por 5 aislamientos, entre los que se caracterizaron a los géneros *Neofusicoccum* y *Phyllosticta/Guignardia*. Dos aislamientos (N3 y N4) se asociaron con *Neofusicoccum kwambonambiense* y *N. brasiliense*, un aislamiento (Nca3) se asoció con *Phyllosticta elongata* y *Guignardia manguiiferae*, y otros tres aislamientos (Gp, 84 y S/N) se caracterizaron sólo a nivel de género asociado con *Phyllosticta*.

Pleosporales: fue representado por tres aislamientos, uno (56) asociado a *Curvularia lunata*, *C. australiensis* y *C. crepinii*, otro aislamiento (Gt) relacionado con *Microsphaeropsis arundinis*, y el aislamiento Rc1 en el BLAST se asoció con el orden pleosporales con un valor mayor al 90% de similitud sin poder ser representado en el árbol.

Trichosphaeriales: fue representado por un aislamiento asociado que se asoció con *Nigrospora* en el BLAST con un valor mayor al 90% de similitud sin poder ser representado en el árbol, lo mismo para dos aislamientos que se asociaron al género *Trichoderma*.

Xilariales: también representado por un solo aislamiento (22), mostró similitud sólo a nivel de género con *Eutypa*.

### 1.3. Caracterización cultural de bacterias

Las características morfológicas de las colonias en TSA como el tamaño, forma, bordes, superficie, consistencia y pigmentación permitieron agrupar aislamientos idénticos y seleccionarlos para su caracterización molecular. Del total de aislamientos (193), fueron agrupados por sus características morfológicas similares en 115 aislamientos que luego fueron analizados por sus perfiles electroforéticos a partir de REP-PCR y se formaron 98 grupos.

### 1.4. Caracterización molecular de bacterias y análisis filogenético

Los patrones generados a partir de las secuencias analizadas por REP-PCR fueron observados en gel de metafor y permitieron determinar la diversidad genotípica de los aislamientos bacterianos. Con los perfiles electroforéticos (115 aislamientos) se construyó un dendrograma utilizando el software GelCompar. El dendrograma mostró una elevada diversidad genotípica y el nivel de corte realizado en el 80% de similitud genética permitió obtener 98 grupos de aislamientos (Fig. 13). En el árbol se indicaron los grupos de aislamientos por el género determinado según el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr. Los primeros grupos de géneros formados pertenecen a la clase Actinobacterias, luego se agruparon géneros pertenecientes a la clase Alfa Proteobacteria, le siguen un género de la clase Gama Proteobacteria y otro género de Beta Proteobacteria y por último se formaron tres grupos de géneros pertenecientes a la clase Firmicutes (*Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*).

Un total de 98 aislamientos de bacterias fueron caracterizados al menos a nivel de género mediante análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr. Del total de secuencias se obtuvieron 69 secuencias diferentes representadas en los árboles filogenéticos de géneros y clases. La mayoría de los aislamientos mostraron una similitud por encima del 97% dentro de cada taxón. La relación de los aislamientos bacterianos con las cepas tipo de especies relacionadas se demostró en los

árboles filogenéticos generados por ML con valores de bootstrap de 1.000 replicas usando el software MEGA.5. El análisis permitió determinar que los aislamientos bacterianos se agruparon en las clases Actinobacterias,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacterias y Firmicutes, incluyendo 20 diferentes géneros, *Aeromicrobium*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Curtobacterium*, *Herbiconiux*, *Kineococcus*, *Leucobacter*, *Lysinibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Phenylobacterium*, *Rhizobium*, *Roseomonas*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas* y *Xylophilus*.



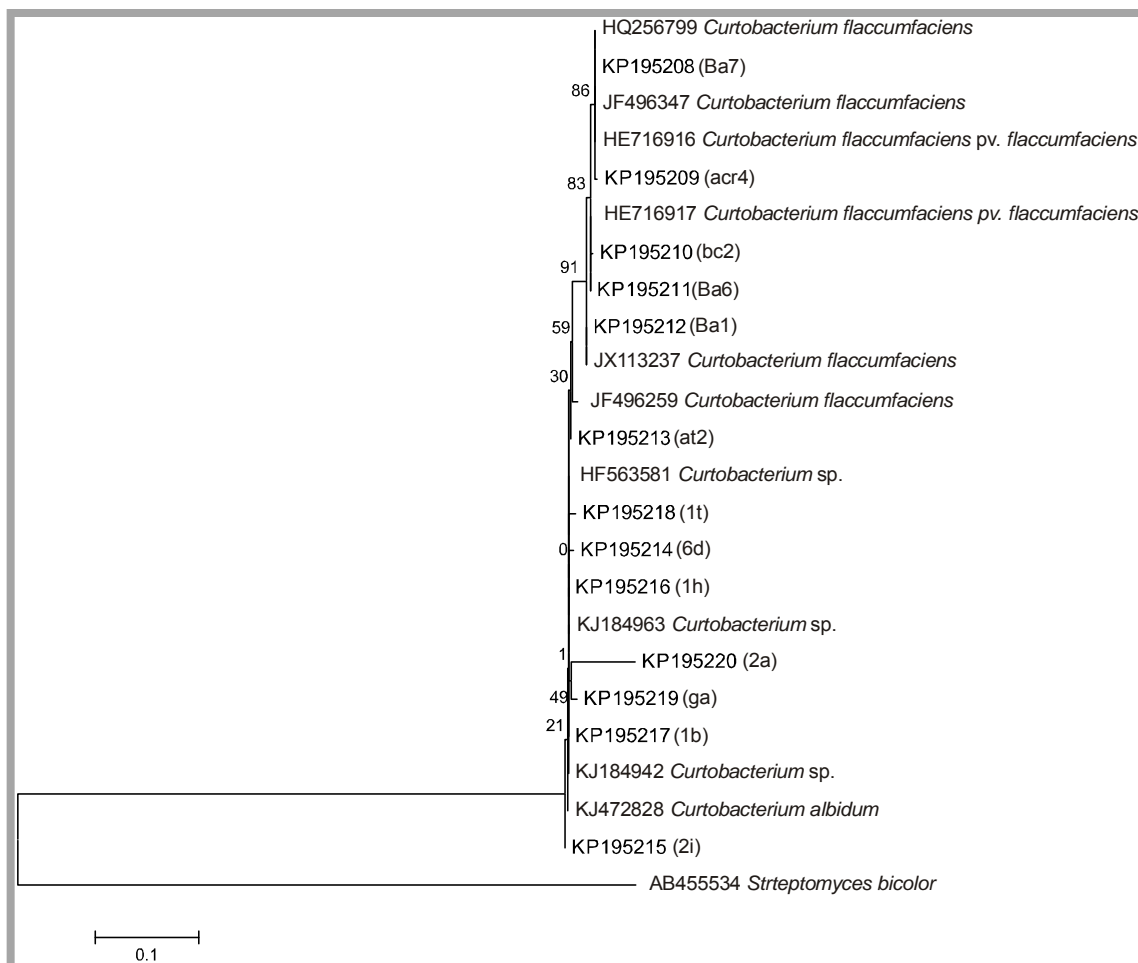
**Figura 13:** Dendrograma que muestra la relación entre los aislamientos de bacterias endofíticas representativas de yerba mate basado en REP-PCR y análisis de UPGMA generado por el software GelCompar.



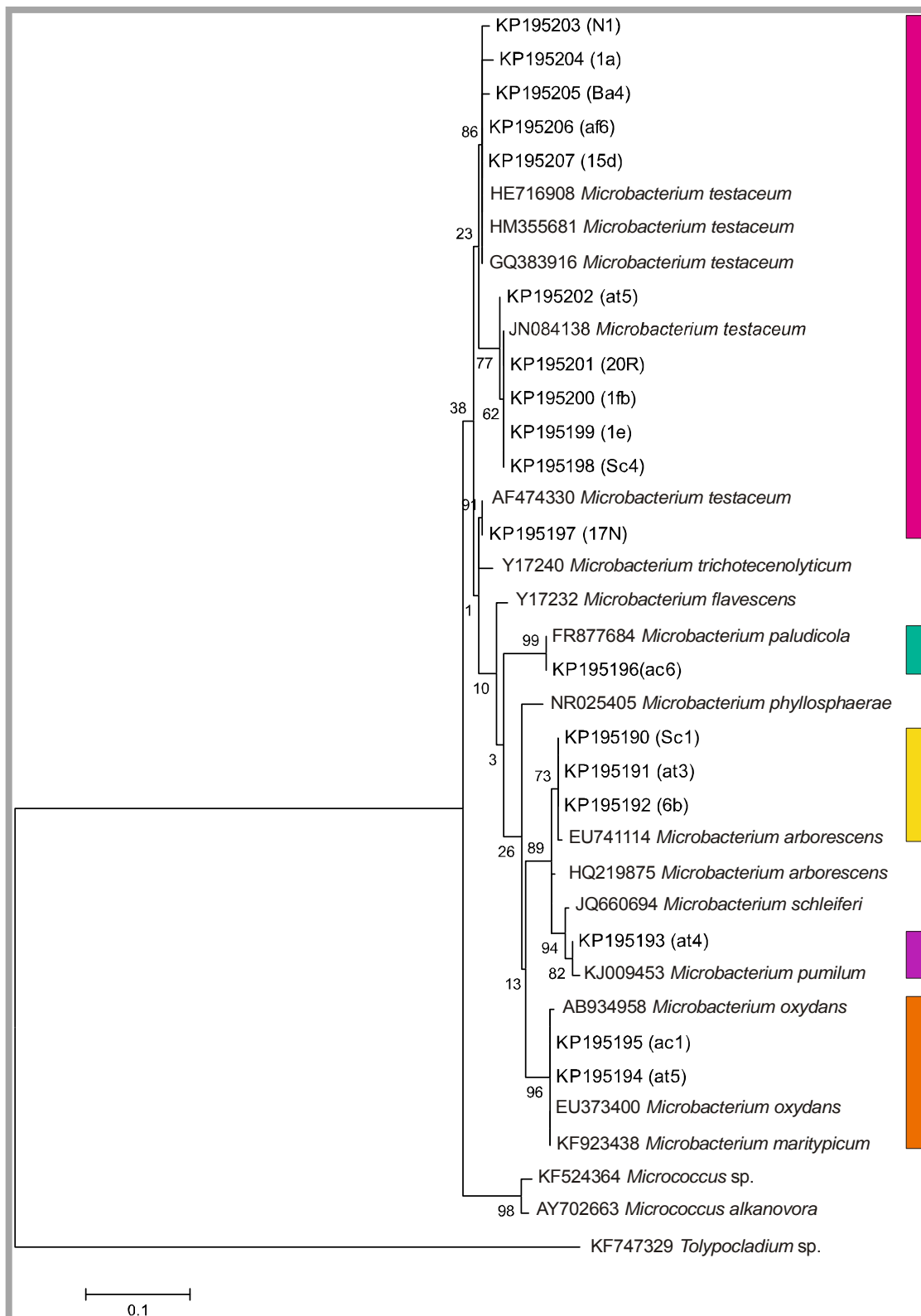
Actinobacterias: es el grupo con más aislamientos bacterianos, representó el 61% del total y los géneros más numerosos a los que se asociaron fueron *Curtobacterium* y *Microbacterium*.

-*Curtobacterium*: 46 aislamientos se relacionaron con este género (Fig. 14). El árbol no permitió asociar los aislamientos con diferentes especies porque las secuencias nucleotídicas obtenidas presentaron una baja longitud. Sólo se formaron tres grupos asociados con las especies, *C. flaccumfaciens*, *C. pusillum*, y *C. albidum*.

-*Microbacterium*: contiene 42 aislamientos asociados a 5 diferentes especies. En el árbol se representaron tres aislamientos (Sc1, at3 y 6b) que se relacionaron con *M. arborescens*, el aislamiento at4 se asoció a *M. pumilum*, at5 y ac1 se asociaron con *M. maritpicum* y *M. oxydans*, ac6 con *M. paludicola*, y 11 aislamientos (17N, Sc4, 1fb, 1e, 20R, at5, Ba4, N1, 1a, af6 y 15d) fueron asociados a *M. testaceum*, (Fig. 15).



**Figura 14:** Árbol filogenético del género *Curtobacterium* basado en el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap).



**Figura 15:** Árbol filogenético del género *Microbacterium* basado en el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap). Barras de colores indican diferentes especies de *Microbacterium*.

Los 27 aislamientos restantes que formaron parte de la clase Actinobacteria, se asociaron con 6 géneros diferentes, *Herbiconiux*, *Kineococcus*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* y *Aeromicrobium* (Fig. 16).

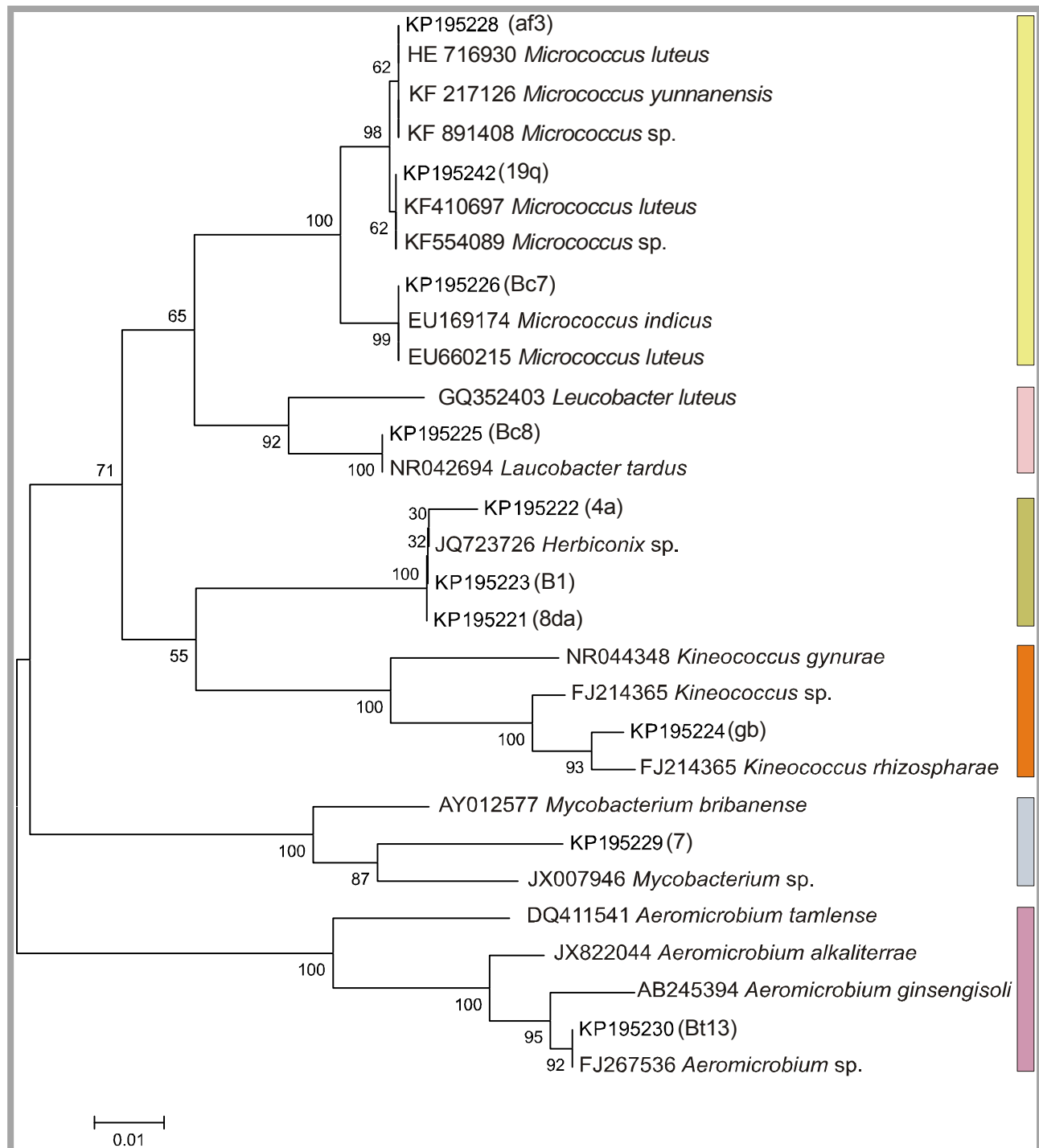
-*Herbiconiux*: corresponde a 7 aislamientos que fueron representados en el árbol filogenético por tres aislamientos (8da, 4a, B1) agrupados con *Herbiconiux* sp., los 4 aislamientos restantes (ac2, Bp2, ac5 y ac3) no pudieron ser representados en el árbol filogenético sin embargo en el BLAST mostraron una similitud mayor a 95% con el género.

-*Kineococcus*: dos aislamientos representados por uno gb asociado a *K. rhizosphaerae*.

-*Leucobacter*: contiene tres aislamientos representados por un aislamiento (Bc8) y se relacionó, con 100% de valor de similitud, con *L. tardus*.

-*Micrococcus*: los 7 aislamientos se asociaron con 4 especies, fueron representados por un aislamiento (Bc7) asociado con *M. indicus*, el aislamiento 19q con *M. luteus*, y el aislamiento af3 se asoció a *M. luteus* y *M. yunnanensis* (Fig. 16).

Por otra parte, un aislamiento (7) que representó a 4 aislamientos fue caracterizado a nivel de género y se agrupó con *Mycobacterium* (Fig. 16), y el aislamiento Bt13 se agrupó con *Aeromicrobium ginsengisoli*.



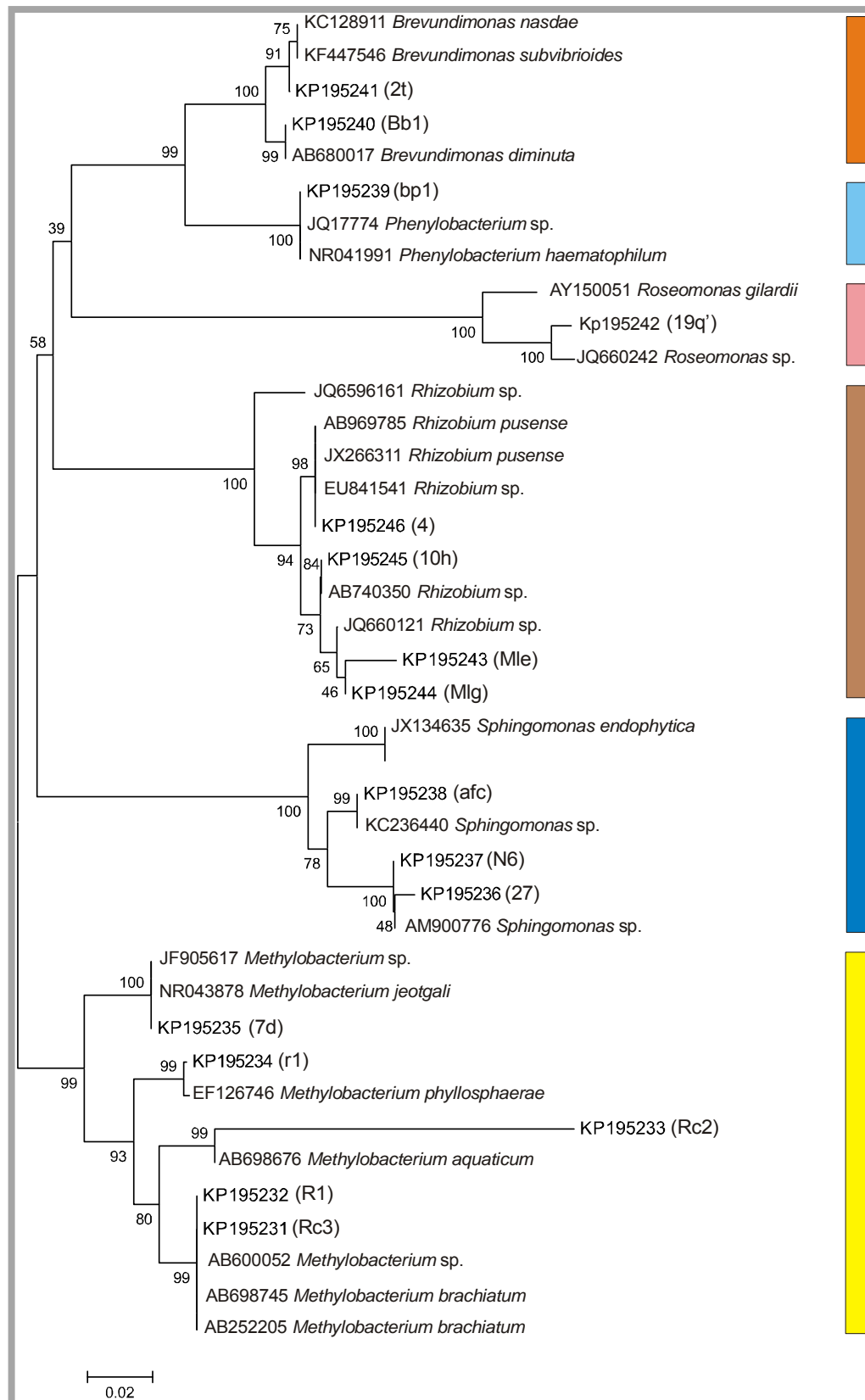
**Figura 16:** Árbol filogenético de la clase Actinobacteria basado en el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap). Barras de colores indican diferentes géneros.

$\alpha$  Proteobacterias: (Fig. 17) formado por 23 aislamientos se asociaron con 6 géneros, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Phenylobacterium*, *Brevundimonas*, *Roseomonas* y *Rhizobium*.

-*Methylobacterium*: compuesto por 8 aislamientos representados por dos (Rc3 y R1) que mostraron similitud con *M. brachiatum*, por un aislamiento (Rc2) que fue asociado con *M. aquaticum*, los aislamientos r1 y 7d que se agruparon con *M. phyllosphaerae* y con *M. jeotgali*, respectivamente.

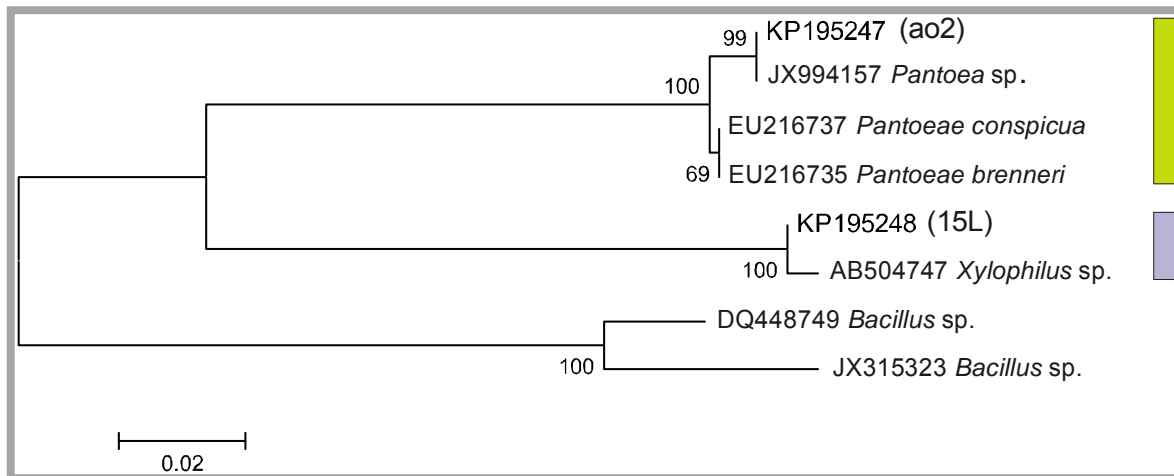
-*Sphingomonas*: formado por 6 aislamientos representados por tres aislamientos (27, afc y N6) representados en el árbol filogenético y asociados con *Sphingomonas*, y tres aislamientos (1g, 1i y ao1) que no pudieron ser representados en el árbol filogenético, sin embargo mostraron una similitud mayor a 95% en el BLAST con el género.

Además de los dos grupos formados en el árbol filogenético de  $\alpha$  Proteobacteria (un grupo asociado a *Methylobacterium* y el otro a *Sphingomonas*), 11 aislamientos fueron asociados a 4 géneros del orden Caulobacterales: *Phenylobacterium*, *Brevundimonas*, *Roseomonas* y *Rhizobium*. El aislamiento bp1 se relacionó con *Phenylobacterium haematophilum*, las cepas Bb1 y 2t se asociaron a *Brevundimonas diminuta*, *B. nasdae* y *B. subvibrioides*. Las cepas 19p y 19q se relacionaron sólo a nivel de género con *Roseomonas*, y las cepas MLe, MLg, 10h y 4 con *Rhizobium*.



**Figura 17:** Árbol filogenético de la clase Alfa Proteobacteria basados en el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap).

Siete aislamientos se relacionaron con las clases  $\gamma$  y  $\beta$  Proteobacteria por lo que se construyó un solo árbol filogenético para ambos. El aislamiento 15L representó a 4 aislamientos y se asoció con *Xylophilus* perteneciente a la clase  $\beta$  Proteobacteria y ao2 representó a tres aislamientos y se asoció a *Pantoea* de la clase  $\gamma$  Proteobacteria (Fig. 18).

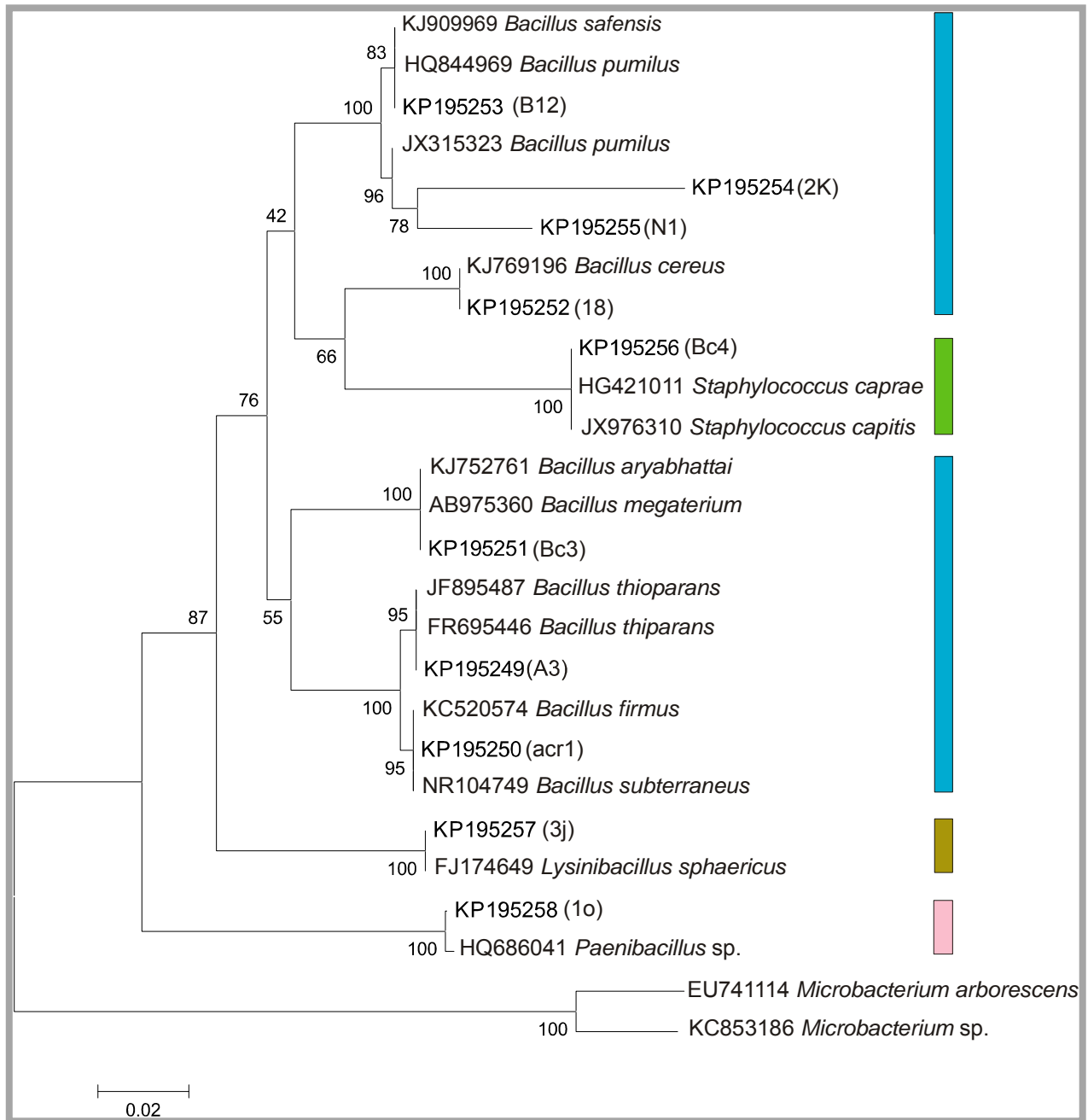


**Figura 18:** Árbol filogenético de las clases Beta y Gama Proteobacterias basado en el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr de bacterias endofíticas de yerba mate y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap).

Firmicutes: se constituyó por 35 aislamientos relacionados con especies de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus* (Fig. 19).

-*Bacillus*: representado por 36 aislamientos que fueron representados por 5 aislamientos (Fig. 18). El aislamiento 3a se agrupó con *B. thioparans*, ac1 mostró similitud con *B. subterraneus* y *B. firmus*, Bc3 se relacionó con *B. aryabhatai* y *B. megaterium*, el aislamiento 18 se asoció con *B. cereus* y los tres aislamientos restantes (12b, 2K y 1N) se agruparon con *B. pumilus*. Además tres aislamientos (1J, 1i y ao1) que no pudieron ser representados en el árbol filogenético sin embargo en el BLAST mostraron una similitud mayor a 95% con el género.

-*Staphylococcus*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*: cada uno formados por 1, 3 y 5 aislamientos respectivamente. Fueron representados por Bc4 asociado con *Staphylococcus caprae* y *S. capitis*, 3j se agrupó con *Lysinibacillus sphaericus*, y 1O se asoció sólo a nivel de género con *Paenibacillus*.



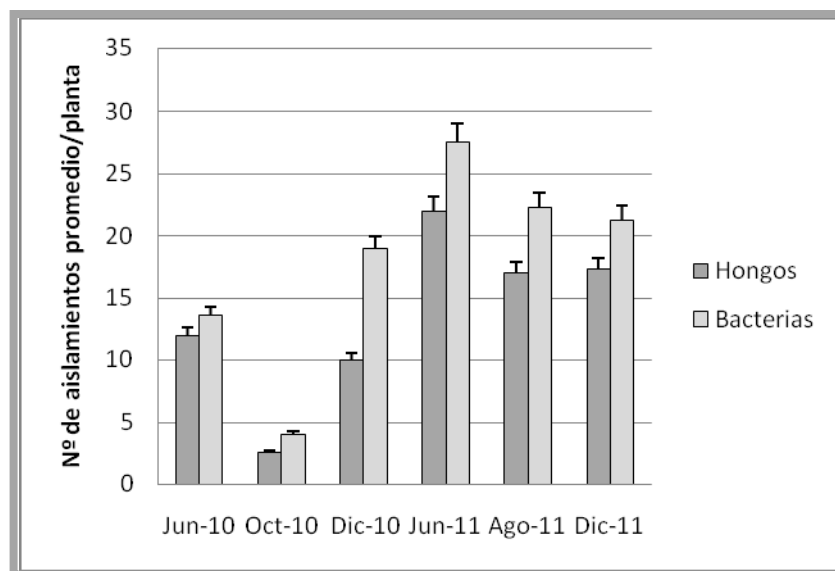
**Figura 19:** Árbol filogenético de la clase Firmicutes basados en el análisis de secuencias parciales del 16S del gen de ARNr de bacterias endofitíticas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y especies de referencia obtenidas del Genbank construido por ML (1000 réplicas bootstrap). Barras de colores indican diferentes géneros.



## 2. Comunidad endofítica de plantas de yerba mate bajo condiciones de campo

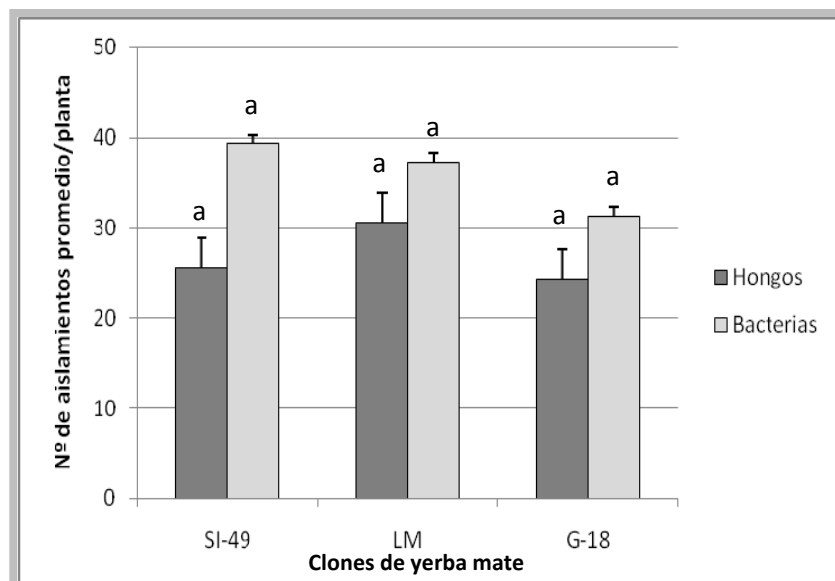
### 2.1. Número de aislamientos

El número de aislamientos de hongos y bacterias promedio de 3 plantas varió entre los muestreos del año 2010 y 2011, siendo los aislamientos del año 2011 mayores que los del año 2010. Los mayores registros de aislamientos de hongos y bacterias se obtuvieron en Diciembre, Junio y Agosto 2011 (Fig. 20).



**Figura 20:** Número de aislamientos de hongos y bacterias endofíticos promedio de 3 plantas en cada fecha de muestreo de plantas de yerba mate. Dic-10 o Dic-11: Diciembre de 2010 o 2011, Jun-10 o Jun-11: Junio de 2010 o 2011, Oct-10: Octubre de 2010, Ago-10: Agosto de 2011. Las barras representan el desvío estándar.

El número de aislamientos de hongos y bacterias no presentó diferencia significativa entre clones (SI-49, LM, G18). Sin embargo, hubo un mayor número de aislamientos fúngicos en el clon LM y bacterianos en el clon SI-49 (Fig. 21).



**Figura 21:** Número de aislamientos promedio por 3 plantas de hongos y bacterias endofíticos en cada clon de yerba mate. Letras distintas (ab) indican diferencia significativa (Prueba F de análisis de variancia). Las barras representan el desvío estándar.

En relación al tipo y edad de los órganos, los aislamientos de hongos prevalecieron en hojas, los de bacterias en tallos, y en ambos casos en órganos adultos. Teniendo en cuenta la fecha de muestreo, el número de aislamientos de hongos fue significativamente mayor en hojas que en tallos en Diciembre y Junio de 2010, en los demás muestreos las diferencias no fueron significativas. En cuanto a la edad del órgano, los aislamientos de hongos en todos los muestreos predominaron en órganos adultos excepto en el muestreo de Junio de 2011, sin embargo, ninguna diferencia resultó ser significativa (Tabla 5). Respecto al número de aislamientos de bacterias, en todos los muestreos fue mayor en tallos que en hojas, presentando sólo diferencias significativas en los muestreos del año 2011. Las diferencias en el número de aislamientos de bacterias entre órganos vegetales jóvenes o adultos en ninguno de los muestreos fueron significativamente diferentes (Tabla 6).

**Tabla 5:** Número de aislamientos (Ai) de hongos en hojas (H) y tallos (T) y en órganos jóvenes (OJ) y adultos (OA) de plantas de yerba mate en seis muestreos.

Mes de muestreo	Nº Ai en H	Nº Ai en T	Valor Probabilidad	Nº Ai OJ	Nº Ai OA	Valor Probabilidad
<b>Junio 2010</b>	23	13	0,0070*	14	22	0,1102
<b>Octubre 2010</b>	2	8	0,0703	10	-	-
<b>Diciembre 2010</b>	22	8	0,0227*	14	16	0,8318
<b>Junio 2011</b>	36	30	1	33	33	0,1818
<b>Agosto 2011</b>	22	26	1	21	27	0,2912
<b>Diciembre 2011</b>	26	26	1	20	32	0,1189
<b>Total Ai</b>	131	111	-	112	130	-

\* Diferencias significativas  $P < 0,05$  (Prueba de Signo)

**Tabla 6:** Número de aislamientos (Ai) de bacterias en hojas (H) y tallos (T) y en órganos jóvenes (OJ) y adultas (OA) de plantas de yerba mate en seis muestreos.

Mes de muestreo	Nº Ai en H	Nº Ai en T	Valor Probabilidad	Nº Ai en OJ	Nº Ai en OA	Valor Probabilidad
<b>Junio 2010</b>	16	24	0,2024	19	21	0,8777
<b>Octubre 2010</b>	5	7	0,3633	12	-	-
<b>Diciembre 2010</b>	23	34	0,0843	31	26	0,6374
<b>Junio 2011</b>	14	69	0*	29	54	0,7655
<b>Agosto 2011</b>	3	64	0*	24	43	0,9319
<b>Diciembre 2011</b>	12	51	0*	28	35	0,4073
<b>Total Ai</b>	73	249	-	143	179	-

\* Diferencias significativas  $P < 0,05$  (Prueba de Signo)

## 2.2. Frecuencia y Diversidad

Los géneros de hongos más frecuentes entre los muestreos fueron *Fusarium* (6 fechas de muestreo), *Colletotrichum* (5), *Phyllosticta/Guignardia* (4), *Cercospora* y *Penicillium* (3). Otros géneros aislados en 1 o 2 muestreos fueron: *Aspergillus*, *Curvularia*, *Eutypa*, *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Phomopsis/Diaporthe*, *Paecilomyces* y *Trichoderma* (Tabla 7). Los géneros de bacterias más frecuentes entre los muestreos fueron *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* y *Sphingomonas* (5 fechas de muestreos), *Herbiconiux* (4), *Methylobacterium* y

*Rhizobium* (3), *Brevundimonas*, *Micrococcus* y *Pseudonocardia* (2) (Tabla 8). Otros 10 géneros fueron detectados sólo en un muestreo.

**Tabla 7:** Géneros de hongos endofíticos aislados de yerba mate según fecha de muestreo (gris= presencia del hongo, blanco= ausencia del hongo).

Muestras Géneros	Dic 2010	Jun 2010	Oct 2010	Dic 2011	Jun 2011	Ago 2011
<i>Aspergillus</i>						
<i>Cercospora</i>						
<i>Colletotrichum</i>						
<i>Curvularia</i>						
<i>Eutypa</i>						
<i>Fusarium</i>						
<i>Microsphaeropsis</i>						
<i>Neofusicoccum</i>						
<i>Nigrospora</i>						
<i>Paecilomyces</i>						
<i>Penicillium</i>						
<i>Phyllosticta/Guignardia</i>						
<i>Phomopsis/Diaporthe</i>						
<i>Trichoderma</i>						

**Tabla 8:** Géneros de bacterias endofíticas aisladas de yerba mate según fecha de muestreo (gris= presencia de la bacteria, blanco= ausencia de la bacteria).

Muestras Géneros	Dic 2010	Jun 2010	Oct 2010	Dic 2011	Jun 2011	Ago 2011
<i>Bacillus</i>						
<i>Brevundimonas</i>						
<i>Curtobacterium</i>						
<i>Herbiconiux</i>						
<i>Methylobacterium</i>						
<i>Microbacterium</i>						
<i>Micrococcus</i>						
<i>Pseudonocardia</i>						
<i>Rhizobium</i>						
<i>Sphingomonas</i>						

La frecuencia relativa de colonización se calculó para determinar presencia de géneros endofíticos dominantes en yerba mate. Se calculó como el número de segmentos (tallos y hojas) colonizados por un género de hongo o bacteria dado dividido por el número total de segmentos expresado en porcentaje (% CF) la fórmula es:  $\% CF = (N_{col} / N_t) \times 100$ ; donde  $N_{col}$  = Número de segmentos colonizados por cada hongo y  $N_t$  = número total de segmentos estudiados (Hata y Futai, 1995). El género de hongo dominante fue *Fusarium* con 63%, seguido por los géneros *Penicillium* (9,9%), *Colletotrichum* (7,4%) y *Phomopsis* (6,2 %); los demás géneros, tuvieron una frecuencia de colonización de 1,2 a 4,3 % (Tabla 9).

**Tabla 9:** Número de aislamientos y frecuencia de colonización (%CF) de hongos endofíticos en hojas y tallos en yerba mate

HONGOS	Nº aislamientos	FC (%)
<i>Aspergillus</i>	3	1,8
<i>Cercospora</i>	7	4,3
<i>Colletotrichum</i>	12	7,4
<i>Curvularia</i>	2	1,2
<i>Fusarium</i>	102	63
<i>Guignardia /Phyllosticta</i>	3	1,8
<i>Gliocladium</i>	5	3,1
<i>Penicillium</i>	16	9,9
<i>Phomopsis</i>	10	6,2
<i>Trichoderma</i>	2	1,2
<b>Nº Aislamientos caracterizados</b>	162	~100

La caracterización a nivel de especie del género *Fusarium*, permitió determinar que la especie dominante fue *F. oxysporum* (22,5%), seguida de *F. pseudocircinatum* (14,7%), *F. lateritium* y *F. verticilloide* (11,8%). Las demás especies *F. circinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. solani* y *F. subglutinans*, estuvieron presente en una proporción de 10,8% o menor, el resto de los aislamientos (19,6%) se caracterizaron a nivel de género. Teniendo en cuenta la fecha de muestreos, la especie más frecuente fue *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *F. verticilloide* y *F. subglutinans*. Las demás especies de *Fusarium* fueron aisladas en menos de 3 fechas de muestreo (Tabla 10).

**Tabla 10:** Número de aislamientos y proporción de especies de *Fusarium* para cada mes de muestreo (Jun: Junio, Agos: Agosto Oct: Octubre, Dic: Diciembre)

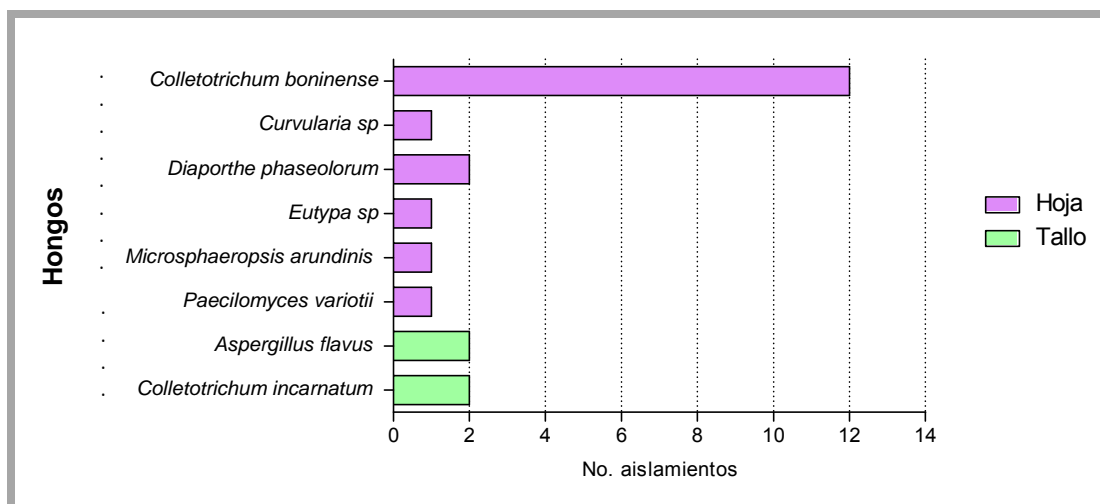
Muestreo Ident. Molecular	Jun 2010	Oct 2010	Dic 2010	Jun 2011	Agos 2011	Dic 2011	Nº aislam	%
<i>F. circinatum</i>	0	0	0	0	0	4	4	3,9
<i>F. laterium</i>	0	0	0	3	0	9	12	11,8
<i>F. oxysporum</i>	1	1	0	4	13	4	23	22,5
<i>F. pseudonygamai</i>	0	0	0	1	0	0	1	1
<i>F. pseudocircinatum</i>	0	0	1	5	5	4	15	14,7
<i>F. solani</i>	0	0	0	2	0	2	4	3,9
<i>F. verticilloide</i>	0	0	5	0	2	4	11	10,8
<i>F. subglutinans</i>	0	0	0	4	7	1	12	11,8
<i>Fusarium</i> sp.	2	0	1	9	6	2	20	19,6
TOTAL	3	1	7	25	32	21	102	100

En cuanto a la frecuencia de colonización de bacterias (% CF) *Curtobacterium* (24%), *Microbacterium* (22%) y *Bacillus* (19%) fueron los géneros con mayor frecuencia de colonización, seguidos por *Herbiconiux* (5,8%), *Methylobacterium* (4%), *Micrococcus* (3,7%) y *Sphingomonas* (3,2%). Los demás géneros tuvieron una frecuencia que varió entre 0,5 a 2,7% (Tabla 11).

**Tabla 11:** Número de aislamientos y Frecuencia de colonización (% CF) de bacterias endofíticas en hojas y tallos de yerba mate

BACTERIA	Aislamientos	CF (%)
<i>Aeromicrobium</i>	1	0,5
<i>Bacillus</i>	36	19
<i>Brevundimonas</i>	2	1,1
<i>Curtobacterium</i>	46	24
<i>Herbiconiux</i>	11	5,8
<i>Kineococcus</i>	2	1,1
<i>Leucobacter</i>	3	1,5
<i>Lysinibacillus</i>	3	1,5
<i>Methylobacterium</i>	8	4
<i>Microbacterium</i>	42	22
<i>Micrococcus</i>	7	3,7
<i>Mycobacterium</i>	4	2,1
<i>Paenibacillus</i>	5	2,7
<i>Pantoea</i>	3	1,5
<i>Phenyllobacterium</i>	1	0,5
<i>Rhizobium</i>	4	2,1
<i>Roseomonas</i>	2	1,1
<i>Sphingomonas</i>	6	3,2
<i>Staphylococcus</i>	1	0,5
<i>Xylophilus</i>	4	2,1
<b>Nº total aislamientos</b>	<b>191</b>	<b>100</b>

Entre los endófitos de yerba mate hubo taxones que sólo se aislaron de hojas o de tallos. Hongos como *Colletotrichum boninese*, *Curvularia* sp., *Diaporthe phaseolorum*, *Eutypa* sp., *Microsphaeropsis arundinis* y *Paecilomyces variotii*, colonizaron solamente hojas, mientras que *Aspergillus flavus* y *Colletotrichum incarnatum* fueron aislados sólo de tallos (Fig. 22).



**Figura 22:** Hongos endofíticos aislados de hojas o tallos de plantas de yerba mate.

En cuanto a las especies de *Fusarium* caracterizadas y teniendo cuenta el tipo y edad de órgano, el mayor número de aislamientos del género *Fusarium* se obtuvo en tallos y en órganos adultos, presentando casi el doble de aislamientos que en órganos jóvenes (Tabla 12). Las especies de *Fusarium* presentes tanto en hojas como en tallos jóvenes y adultos fueron *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *F. subglutinans* y *F. verticilloide*. Las demás especies como *F. circinatum* se aislaron de hoja adulta, tallo joven y adulto, *F. solani* se aisló de hojas jóvenes y adultas, y *F. pseudonygama* sólo de hojas jóvenes (Tabla 13).

**Tabla 12:** Número de aislamientos de *Fusarium* en tipo de órgano (hoja y tallo) y edad (joven y adulto) del mismo en plantas de yerba mate. Se presentan las medias  $\pm$  desvío estándar.

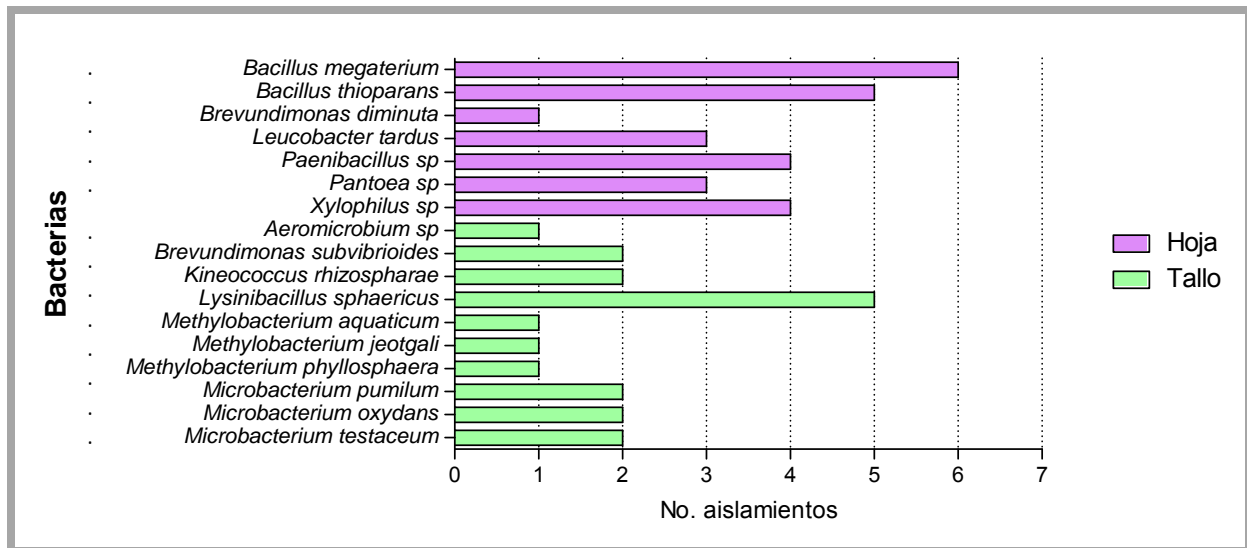
Órgano \ Edad	Joven	Adulto	Total
Hoja	16 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3	46 $\pm$ 1
Tallo	21 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	56 $\pm$ 3,5
<b>Total</b>	37 $\pm$ 2	65 $\pm$ 5	102



**Tabla 13:** Órganos y edades de tejidos en lo que aparecen especies de *Fusarium* (gris= presencia del hongo, blanco= ausencia del hongo).

	Órgano y edad del tejido			
	Hoja Joven	Hoja Adulta	Tallo Joven	Tallo Adulto
<i>F. circinatum</i>				
<i>F. lateritium</i>				
<i>F. oxysporum</i>				
<i>F. pseudocircinatum</i>				
<i>F. pseudonygama</i>				
<i>F. solani</i>				
<i>F. subglutinans</i>				
<i>F. verticillioides</i>				

Una gran parte de los taxones de bacterias identificados en yerba mate estuvieron presentes tanto en hojas como en tallos, exceptuando *Bacillus megaterium*, *B. thioparans*, *Brevundimonas diminuta*, *Leucobacter tardus*, *Paenibacillus* sp., *Pantoea* sp. y *Xylophilus* sp., sólo colonizaron hojas, mientras *Aeromicrobium* sp., *Brevundimonas subvibrioides*, *Kineococcus rhizosphaerae*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium jeotgaly*, *Methylobacterium phyllosphaerae*, *Microbacterium pumilum*, *Microbacterium oxydans* y *Microbacterium testaceum* colonizaron sólo tallos (Fig. 23).

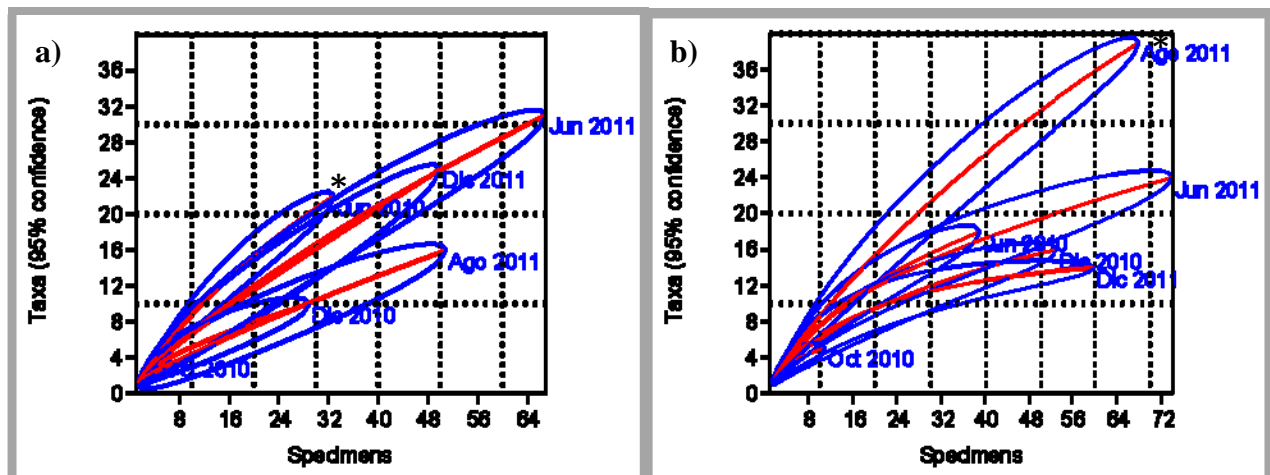


**Figura 23:** Bacterias endofíticas aisladas de hojas o tallos de plantas de yerba mate.

Los índices de Shannon (Shannon y Weaver, 1949) y Simpson (Simpson, 1949) fueron calculados para determinar la riqueza de microorganismos endofíticos en las fechas de muestreos, clones y tipo y edad de órganos. En general, los índices mostraron una mayor riqueza de bacterias que de hongos (índice de Shannon hongos/bacterias: 3,306/3,67, índice de Simpson hongos/bacterias: 0,880/0,949). Las curvas de rarefacción fueron realizadas utilizando el software Past 3.01, y permitieron comparar las riquezas de hongos y bacterias observadas entre fechas de muestreos, clones y tipo y edad de órganos, además el área de error permitió detectar las diferencias significativas entre las comunidades microbianas. La riqueza fúngica predominó significativamente en el muestreo de Junio de 2010, y la bacteriana en Agosto de 2011 (Fig. 24). Por otra parte, si comparamos la riqueza de hongos y bacterias entre las fechas de muestreo de Diciembre y Junio de ambos años, sin considerar los demás, en los muestreos de Junio fueron mayores que los de Diciembre en cada año (Tabla 14).

**Tabla 14:** Índices de Shannon y Simpson de hongos y bacterias endofíticos de yerba mate en 6 fechas de muestreos.

Índice		Jun 2010	Oct 2010	Dic 2010	Jun 2011	Agos 2011	Dic 2011
Hongos	Shannon	2,961	1,332	1,789	2,676	1,578	2,512
	Simpson	0,9403	0,72	0,7634	0,8331	0,5713	0,8288
Bacterias	Shannon	2,63	1,468	2,209	2,758	3,346	2,296
	Simpson	0,9086	0,7438	0,8273	0,9156	0,9455	0,8672

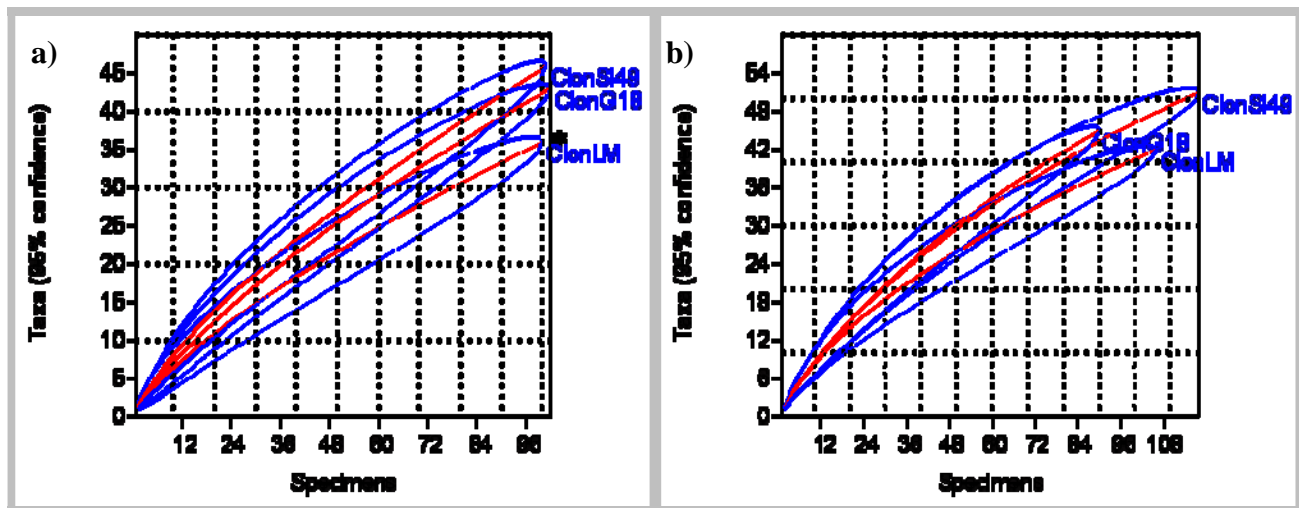


**Figura 24:** Curva de rarefacción de hongos (a) y bacterias (b) endofíticas según fechas de muestreos de plantas de yerba mate. Intervalo de confianza 95%. (\*) Indica diferencia significativa.

En cuanto a clones de yerba mate la riqueza fue mayor en el clon SI-49 respecto a los clones LM y G18 (Tabla 15). Las curvas de rarefacción permitieron determinar una menor riqueza de hongos del clon LM respecto a los otros clones, mientras que para bacterias no se observaron diferencias en riquezas (Fig. 25).

**Tabla 15:** Índices de Shannon y Simpson de hongos y bacterias endofíticos según clon aislados de plantas de yerba mate.

Índice		Clon SI-49	Clon LM	Clon G18
Hongos	Shannon	3,254	2,6	2,947
	Simpson	0,9283	0,8128	0,8652
Bacterias	Shannon	3,498	3,259	3,426
	Simpson	0,9513	0,9422	0,9491

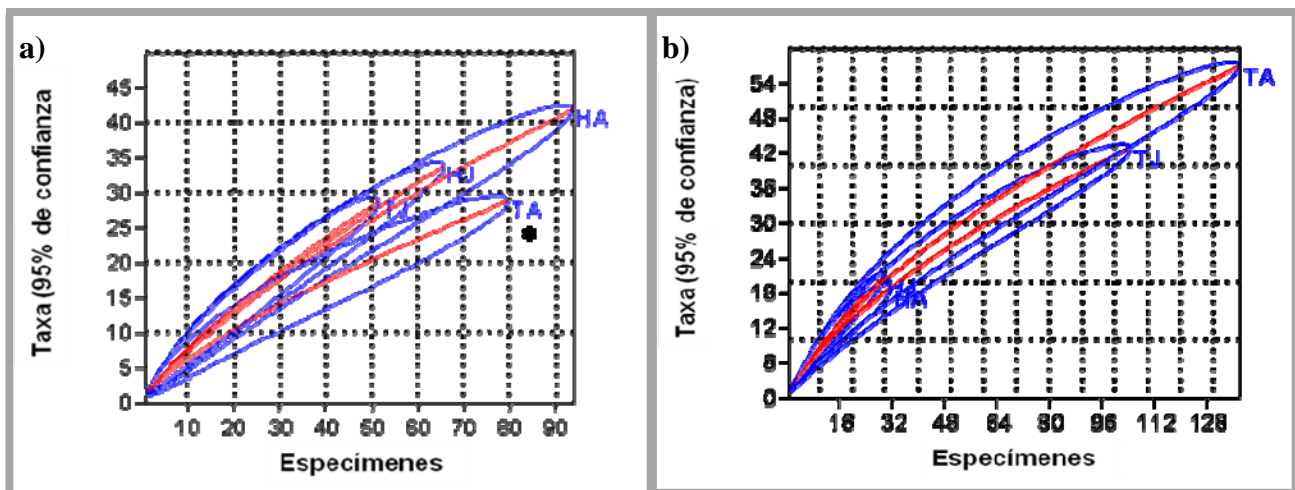


**Figura 25:** Curva de rarefacción de hongos (a) y bacterias (b) endofíticos según clon aislados de plantas de yerba mate. Intervalo de confianza 95%. (\*) Indica diferencia significativa.

La riqueza de hongos predominó en hojas jóvenes, mientras que en bacterias ocurrió en tallos adultos (Tabla 16). Cuando se elaboraron las curvas de rarefacción de especies, se observó que hubo una menor riqueza fúngica en tallo adulto respecto a los demás, mientras que en bacterias la curva no mostró diferencias en la riqueza (Fig. 26).

**Tabla 16:** Índices de Shannon y Simpson de hongos y bacterias endofíticos según órgano y edad aislados de plantas de yerba mate.

Índice		Hoja joven	Hoja adulta	Tallo joven	Tallo adulto
Hongos	Shannon	3,03	2,981	2,828	2,462
	Simpson	0,9169	0,8737	0,8743	0,8069
Bacterias	Shannon	2,922	3,199	2,767	3,547
	Simpson	0,9378	0,9281	0,9258	0,9545

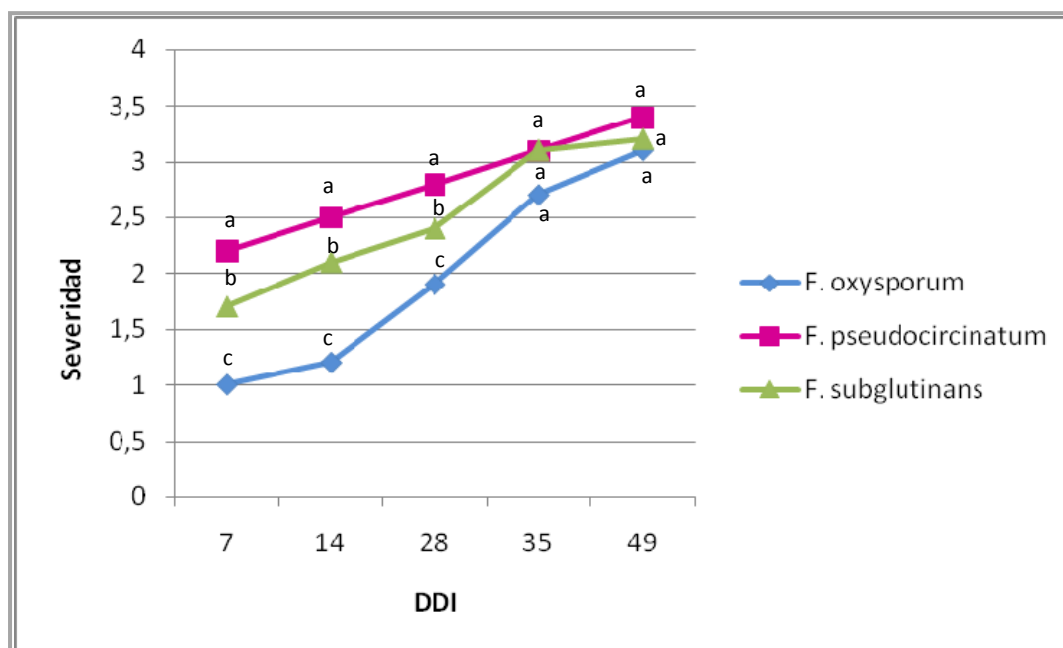


**Figura 26:** Curva de rarefacción de hongos (a) y bacterias (b) endofíticas según órgano y edad de tejido aislados de yerba mate. Intervalo de confianza 95%. (\*) Indica diferencia significativa.

### 3. Prueba de patogenicidad

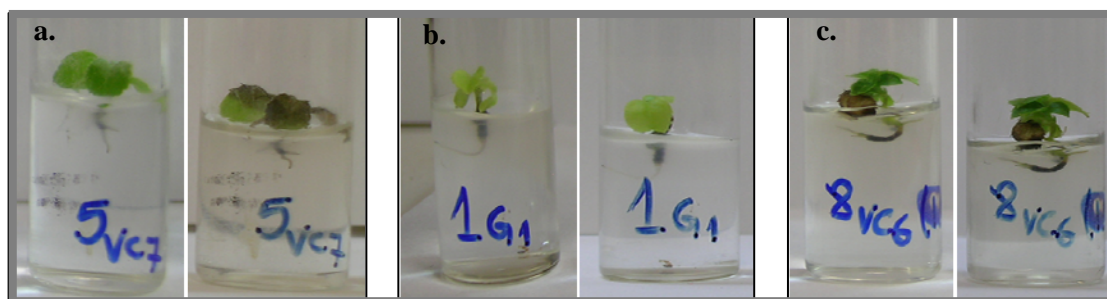
Se seleccionaron las tres especies de *Fusarium* más frecuentes para determinar su grado de patogenicidad en plántulas de yerba mate crecidas *in vitro*. Las especies de *Fusarium* inoculadas fueron *F. pseudocircinatum*, *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. Las tres especies evaluadas resultaron patógenas para los cultivos *in vitro* de yerba mate. El grado de patogenicidad de las especies evaluadas fue

significativamente diferente hasta 28 días después de la inoculación, luego las diferencias no fueron significativas. De las tres especies, *Fusarium pseudocircinatum* fue la más agresiva en los primeros estados de la patogénesis (Fig. 27).



**Figura 27:** Grado de severidad en plántulas de yerba mate inoculadas con *Fusarium pseudocircinatum*, *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. DDI: días después de la inoculación. Letras diferentes indican diferencia significativa (Prueba F de análisis de variancia).

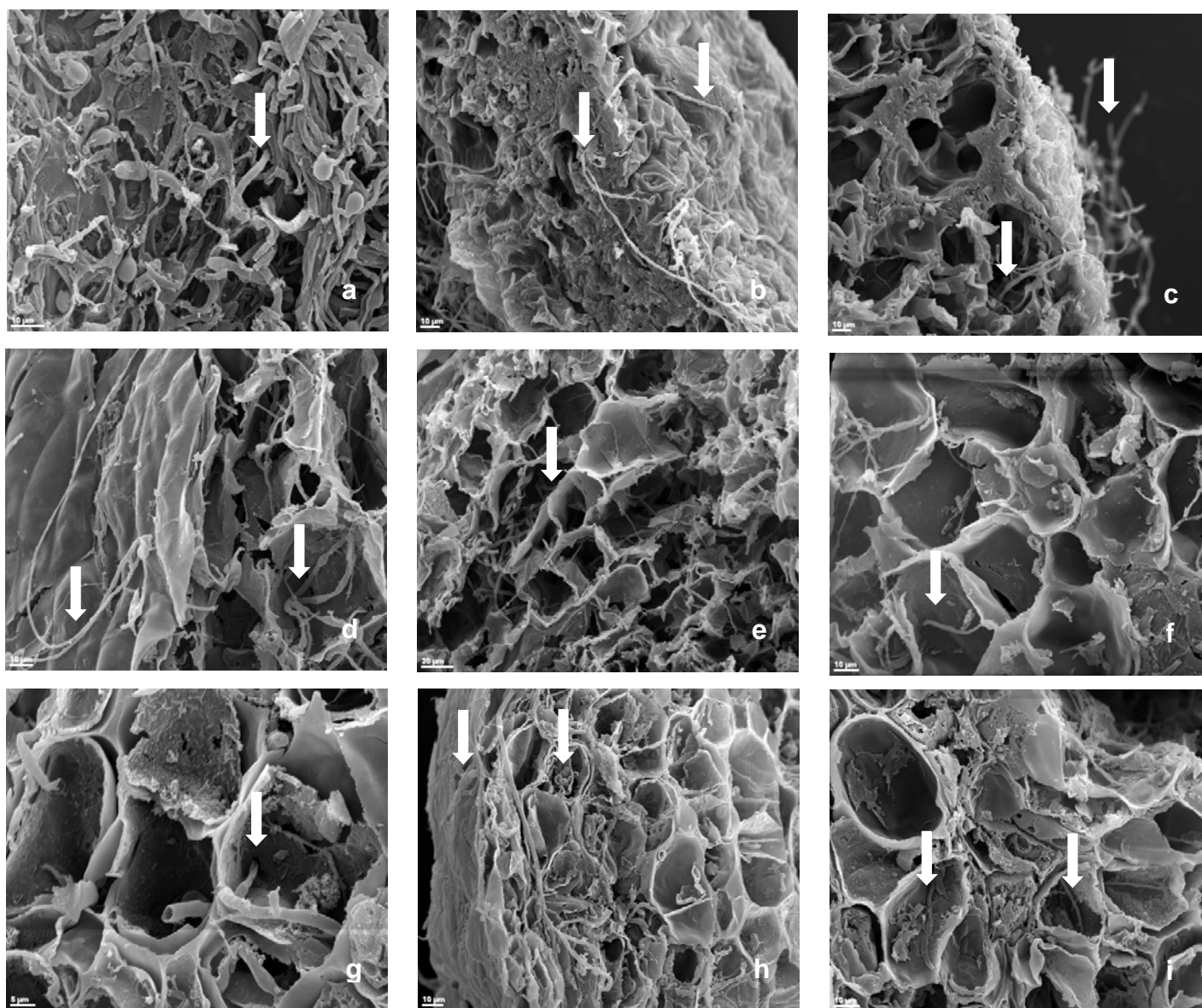
Los síntomas observados en las plántulas inoculadas fueron amarillamiento de hojas, necrosis de cuello de raíz y de hojas y/o necrosis de plántula entera. Estos síntomas variaron de acuerdo al los días luego de la inoculación (Fig. 28).



**Figura 28:** Síntomas observados a los 14 y 49 días después de la inoculación por cada especie de *Fusarium* a. inóculo: *F. pseudocircinatum*, síntoma: necrosado de las hojas, b. inóculo: *F. oxysporum*, síntoma: amarillamientos de hojas, c. inóculo: *F. subglutinans*, síntoma: necrosado de hojas y raíces.



Con el fin de observar el crecimiento de los hongos inoculados en el interior de los tejidos vegetales, se realizó la observación de cortes de las plántulas (por microscopía electrónica de barrido) de yerba mate crecidas *in vitro*. Se evidenció el crecimiento de los hongos tanto en tejidos internos como externos de hojas, tallo y raíces (Fig. 29).



**Figura 29:** Microscopía electrónica de barrido. *Fusarium subglutinans*: a, d, g (cortes de hoja, tallo y raíz respectivamente) *F. pseudocircinatum*: b, e, h (cortes de hoja, tallo y raíz respectivamente), *F. oxysporum*: c, f, i (cortes de hoja, tallo y raíz respectivamente).

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES





## DISCUSIÓN

Una de las dificultades que se presentan en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la contaminación. En sistemas de micropropagación, la elevada contaminación trae aparejada una gran pérdida económica. Su éxito depende en gran medida de las estrategias de prevención y control por lo que es de importancia la identificación y determinación del origen de los organismos contaminantes. En las especies leñosas o semileñosas, el problema de contaminación adquiere mayor importancia debido a que las plantas tienen una mayor población de microorganismos (De Winnaar, 1997). La yerba mate es una especie leñosa que ha presentado altos porcentajes de contaminación principalmente en las etapas de establecimiento del cultivo *in vitro* (Bernasconi *et al.*, 1998; Dutra y Gomes da Silva, 2009). Teniendo en cuenta que los microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* pueden provenir de diferentes fuentes, tanto de las plantas madres crecidas en el campo, de las plantas crecidas en condiciones de invernáculo, o bien ser contaminantes del ambiente (Debergh y Read, 1991; Cassells, 2012), en este trabajo se cultivaron *in vitro* segmentos uninodales de plantas de yerba mate que crecían en condiciones de invernáculo siguiendo los protocolos de desinfección y cultivos utilizados comúnmente para la especie (Sansberro *et al.*, 2000) y se determinó el origen de la contaminación, comparando los hongos y bacterias aislados de los cultivos *in vitro* con aquellos provenientes de plantas que crecían en condiciones de invernáculo y de campo. Se comprobó que los hongos de los géneros *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Setophoma*, y bacterias *Bacillus*, *Pantoea* y *Staphylococcus* provenían de plantas madres donde probablemente habitan como endófitos ya que fueron aislados tanto de cultivos *in vitro* como de plantas de invernáculo. Por otra parte se determinó un grupo de contaminantes que provenían del ambiente de trabajo, entre ellos *Alternaria*, *Acinetobacter* y *Janibacter*. Los géneros de hongos mencionados fueron citados como contaminantes de cultivo *in vitro* de otras especies de plantas, por ejemplo en *Annona muricata* (Ramírez *et al.*, 2005), guayaba (*Psidium guajava* L.) (Acosta *et al.*, 2002) y en palmera datilera (Hameed y Abass, 2006; Al-Mayahi *et al.*, 2010). En cuanto a bacterias, los géneros como *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Bacillus* fueron mencionados, entre otros, en cultivos *in vitro* de ápices de banano (Thomas *et al.*, 2008), *Pantoea* también fue detectada en papaya (Thomas, 2006) y frutilla (Dias *et al.*, 2009). *Stenotrophomonas malthophilia* citada en yerba mate (Luna *et al.*, 2013), no fue encontrada en el presente trabajo, la probable excepción se deba a que en el trabajo citado previamente se trabajó con *I.*

*dumosa*. Algunos hongos y bacterias endofíticos pueden ser patógenos de plantas en función de la etapa de desarrollo del hospedante, factores ambientales y las respuestas de defensa del huésped (Schulz y Boyle, 2005), o bien pueden ser endófitos que obtienen de la planta nutrientes y protegerse de estreses abióticos sin causar daño a la misma (Stone *et al.* 2000). Los géneros de hongos y bacterias aislados de yerba mate fueron citados tanto como endófitos y como patógenos.

La posibilidad de que cierto número de contaminantes del cultivo *in vitro* de yerba mate podría generarse a partir de la población de endófitos que habitan en las plantas, llevó a la necesidad de caracterizar dicha población microbiana. Además, los endófitos son importantes por sus múltiples aplicaciones para la agricultura, como mejorar el rendimiento de la producción de plantas, promotores del crecimiento, protección contra enfermedades, y cultivo en suelos contaminados sujetos a fitorremediación (Martínez Molina *et al.*, 2010). En cuanto a la micropropagación, la caracterización de endófitos es importante como base para el diseño de un sistema de micropropagación más eficiente. Se identificaron 13 géneros de hongos aislados de hojas y tallos de yerba mate, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Guignardia (Phyllosticta)*, *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phomopsis*, y *Trichoderma*. Pimentel (2006) citó algunos de estos géneros como endófitos aislados de hojas de plantas cultivadas de yerba mate en Brasil. Por otra parte, 5 géneros de hongos resultaron ser los mismos que los encontrados en este trabajo, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Por otra parte, se identificaron 20 taxones de bacterias endofíticas. Recientemente se han reportado dos bacterias endofíticas en yerba mate, *Enterobacter* sp. (Collavino *et al.*, 2010) y *Stenotrophomonas malthophilia* (Luna *et al.*, 2013), no halladas en este trabajo. También fue aislada *Pantoea* sp., la cual ha sido previamente asociada con la rizósfera de yerba mate (Collavino *et al.*, 2010). Los diferentes registros en la composición bacteriana y nichos ecológicos sugieren que, excepto para *Pantoea* sp., el establecimiento de endófitos en órganos aéreos de yerba mate pudo haber ocurrido independientemente de la colonización de raíces y que además pudieron influir factores ambientales tales como la humedad y la temperatura.

La planta es un hábitat dinámico en que diversos factores influyen en la composición de especies de microorganismos que la colonizan como el genotipo, la variación estacional y el órgano vegetal (Mocali *et al.*, 2003; Rivera-Orduña *et al.* 2010). En este trabajo, además de caracterizar microorganismos endofíticos en yerba mate, se analizó la influencia de la época del año, genotipo,

órgano aéreo y edad del mismo en las plantas sobre la población de endófitos. Las condiciones ambientales del hospedante influyen sobre el número y la diversidad de endófitos (Kim *et al.* 2013; Scholtysik *et al.* 2013). Los resultados de este trabajo mostraron que el número y la diversidad de hongos y bacterias estuvieron influenciados por las variaciones estacionales, siendo alcanzados los valores más altos durante la temporada de verano y de otoño. Guo *et al.* (2008) determinaron, en acículas de *Pinus tabulaeformis*, que la diversidad de hongos fue mayor en primavera mientras que en verano fue menor. Lo mismo ocurrió en *Quercus ilex* (Collado *et al.*, 1999) y en *Laurus nobilis* L. (Göre y Bucak, 2007). En cuanto a diversidad bacteriana endofítica en *Pinus sylvestris* L. el mayor valor obtenido fue relacionado con el inicio de la actividad vegetal que coincide con la primavera (Pirttilä *et al.*, 2004).

Estos resultados son diferentes a los obtenidos en yerba mate donde el mayor número y diversidad de endófitos fueron en otoño e invierno. Probablemente en yerba mate la variación de la comunidad endofítica entre las diferentes épocas del año esté más influenciada por la temperatura y humedad ambiental que por el inicio de la actividad vegetal. También, se debe tener en cuenta que donde se cultiva yerba mate, las estaciones lluviosas son otoño y verano, el elevado valor de humedad de dichas estaciones es probablemente uno de los factores que favoreció la mayor colonización de hongos y bacterias endofíticas.

Por otra parte, el tipo de órgano vegetal es otro factor que influye en el número y diversidad de endófitos. En leñosas como en *Betula platyphylla*, *Quercus liaotungensis* y *Ulmus macrocarpa* el grado de infección de hongos fue mayor en tallos que en hojas, mientras que la diversidad de endófitos varió entre cada especie (Sun *et al.*, 2012). Pimentel (2006) encontró mayor diversidad de hongos en hojas adultas tanto de plantas nativas como de plantas cultivadas de yerba mate, los mismos resultados se obtuvieron en árboles como *Banksia integrifolia* (MacArthur y McGee, 2006), *Sequoia sempervirens* (Espinosa-García y Langenheim, 1990) y *Camellia japonica* (Osono, 2008). Estos últimos resultados coinciden con lo determinado en este trabajo, obteniéndose mayor número de aislamientos de hongos endofíticos en hojas que en ramas, además se aislaron géneros como *Cercospora*, *Curvularia*, *Eutypa*, *Guignardia* (*Phyllosticta*) y *Paecilomyces* únicamente de hojas. Este hecho podría deberse al tipo de infección. A modo de ejemplo *Curvularia*, *Cercopora*, *Phyllosticta* colonizaron predominantemente las hojas, en tanto que *Aspergillus* y *Colletotrichum* lo hicieron principalmente en ramas. En el caso de

*Phomopsis*, se aisló de hojas y tallos. Se trata de hongos con dispersión e ingreso del tipo localizado, en contraposición al tipo de infección sistémica como algunos *Fusarium*. En cuanto a bacterias, hubo mayor número de aislamientos en tallos que en hojas. Los géneros de bacterias como *Bacillus*, *Leucobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea* y *Rodopseudomonas* se aislaron únicamente de hojas, mientras que un mayor número de géneros se obtuvo en tallos, este resultado coincide con lo obtenido en plantas de *Theobroma cacao* (Melnick *et al.*, 2011). Hirano y Upper (2000) citaron que las bacterias que habitan las hojas normalmente resisten más a las radiaciones solares y generalmente son pigmentadas, en yerba mate habitan bacterias como *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Aeromicrobium*, *Kineococcus*, *Phenylobacterium* y *Lysinibacillus* en el tallo probablemente como consecuencia de una mayor protección a las radiaciones. Este hecho se debe a que las hojas están más expuestas que los tallos a cambios ambientales como la temperatura, la humedad y la irradiación UV, siendo en este sentido el tallo un nicho más estable (Magnani *et al.*, 2010, Guo *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2012).

Algunos estudios han sugerido que la composición de especies y la frecuencia de endófitos varía con la edad del tejido de la planta hospedera (Surynarayanan y Vijaykrishna, 2001; Sun *et al.*, 2012). Muchos autores apoyan la hipótesis de que los tejidos adultos de las plantas han tenido más tiempo para acumular endófitos desde el medio ambiente (Carroll 1978; Guo *et al.*, 2008). Respecto a la edad de los tejidos, si bien no tuvo un efecto significativo sobre la composición de la comunidad de endófitos, el mayor número de hongos y bacterias provino de hojas y tallos adultos. Teniendo en cuenta las prácticas de manejo de las plantas de yerba muestreadas en el campo, se podría explicar la baja variación de la comunidad endofítica. Las hojas de yerba mate se cosechan tres veces al año, en junio, julio-agosto, y septiembre, de tal manera que las ramas y las hojas más antiguas no tienen más que 1 año de edad, por lo que no fue posible ver la influencia de la edad de los órganos, ni tampoco la influencia de las etapas fenológicas de la especie, debido a que no alcanza la etapa de floración.

Además de la importancia de los diferentes factores que influyen sobre los microorganismos endofíticos, conocer la composición de la comunidad endofítica es básico para el desarrollo de tecnologías para la gestión agrícola, en particular las relacionadas con la promoción de crecimiento en base de microorganismos desde los aislamientos disponibles y para estudiar su rol como benéficas. La mayoría de los géneros de hongos endofíticos aislados en este trabajo han sido reportados previamente

en plantas leñosas en varias regiones geográficas y muchos de ellos con actividades benéficas para las plantas (Sette *et al.*, 2006; Hanada *et al.*, 2010; Suryanarayanan *et al.*, 2011). *Fusarium* fue el género de hongo dominante y más frecuente en hojas y tallos de yerba mate, presente en todas las estaciones muestreadas. El mismo fue encontrado en diversas especies de plantas como patógeno, saprófito y endófito. En yerba mate se lo encontró en vivero como uno de los hongos más frecuente causando declinación de plántulas (Grigoletti Junior *et al.*, 1996). Se han citado especies de este género que causan enfermedades de plantas con impacto económico (Guarro y Gene, 1995), generalmente producen enfermedades en tallos y raíces (Kuldau y Yates, 2000; Rubini *et al.*, 2005), por ejemplo *F. solani* causa la pudrición del cuello en *Passiflora edulis* (Fischer y Rezende, 2008) y la pudrición de la mazorca en maíz (Leslie y Summerell, 2006), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* causa podredumbre del cuello y de las raíces en *Lycopersicon esculentum* (Tello y Lacasa, 1988), *F. solani* f. sp. *pini* causa enfermedades en raíces de plántulas de *Pinus patula* (Viljoen *et al.*, 1994).

Este género es de importancia en yerba mate ya que causa pudrición de raíces, con síntomas de amarilleo y pérdida de hojas, detención del crecimiento y, en etapas posteriores, la muerte de la planta (Poletto *et al.*, 2006). También se han encontrado especies de *Fusarium* como patógenos latentes (Schulz y Boyle, 2005; Kharwar *et al.*, 2010). Por otra parte, especies del género *Fusarium* fueron aisladas como endófitas de plantas (Kuldau y Yates, 2000; Rubini *et al.*, 2005). En diversas especies de leñosas fue aislado como endófito dominante (Hanada *et al.*, 2010 y Sun *et al.*, 2012), además en herbáceas (Tan *et al.*, 2012; Qadri *et al.*, 2013), muchas de ellas fueron determinadas como benéficas cumpliendo funciones como promotores de crecimiento de plantas y controladores biológicos (Shiono *et al.*, 2007, Deng *et al.*, 2009). El hecho de que especies de este género se hayan encontrado como patógenos, latentes o endófitos, sugiere que el endofitismo es parte del ciclo de vida de algunas especies de *Fusarium* asociadas a plantas (Kuldau y Yates, 2000). En este trabajo, la inoculación de plántulas con 8 especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *F. lateritium*, *F. verticilloide*, *F. circinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. solani* y *F. subglutinans*) permitió determinar que estas especies en cultivo *in vitro* fueron patógenas mientras que en plantas crecidas en el campo se comportaron como endófitas ya que no se observaban síntomas de enfermedades.

*Penicillium* fue el segundo género más frecuente en hojas y tallos de yerba mate. Este género está ampliamente distribuido en diversos tipos de suelos y ambientes (Christensen *et al.*, 2000; Park *et*

*al.*, 2014). Ha tenido gran atención por ser un importante productor de compuestos bioactivos (Frisvad y Samson, 2004), fitohormonas (Hassan, 2002; Waqas *et al.*, 2012), además de ser solubilizador de minerales y como antagonista de fitopatógenos (Souchie *et al.*, 2006; Wakelin *et al.*, 2006; Nath *et al.*, 2012; Radhakrishnan *et al.*, 2013). Otros dos géneros encontrados con frecuencia en este trabajo fueron *Colletotrichum* y *Phomopsis*. Ambos géneros importantes desde el punto de vista fitopatológico causando diversas enfermedades de hojas, tallos y frutos (Bailey y Jeger, 1992; Van Niekerk *et al.*, 2005; Rossman *et al.*, 2007), además fueron aislados como endófitos en un amplio espectro de hospedantes por ejemplo especies de *Colletotrichum* fueron aisladas de *Coffea arabica* y *C. robusta* (Sette *et al.*, 2006), *Ficus benghalensis* (Suryanarayanan y Vijaykrishna, 2001), *Camellia japonica* (Osono, 2008) y *Theobroma cacao* (Hanada *et al.*, 2010), y especies de *Phomopsis* fueron aisladas de *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) (Gond *et al.*, 2007) y en *Theobroma cacao* L. (Rubini *et al.*, 2005). Los resultados en yerba mate concuerdan en que *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Phomopsis* son típicos endófitos ubicuos ya que fueron aislados de hojas y tallos jóvenes y adultos durante todas las estaciones de muestreo.

Otros géneros de hongos aislados con menor frecuencia en hojas y tallos de yerba también fueron encontrados como endófitos en otras especies vegetales. Si bien este género de hongo fue encontrado produciendo enfermedades de hojas en diversas especies como *Coffea arabica* (Nelson, 2008), especies de *Juniperus* (Rasmussen y DuPlissis, 1999), *Daucus carota* (Milosavljević *et al.*, 2014), *Jatropha curcas* (Dianese *et al.*, 2014), también *Pseudocercospora mate* fue determinada como patógena en yerba mate en Argentina (Braun *et al.*, 2012), entre otras, también fue citada como endófita de diversas plantas como *Eichhornia azurea*, *E. crassipes* (Almeida *et al.*, 2015) y *Andrographis paniculata* (Nayak, 2015). *Gliocladium* fue otro de los géneros poco frecuentes en yerba mate y fue citado en varios trabajos como un importante controlador biológico de *Botrytis cinerea* en *Fragaria ananassa* (Van Delm, 2015). En *Theobroma cacao* controla *Crinipellis pernicioso* agente causal de la enfermedad de la escoba de bruja (Rubini *et al.*, 2005), además *G. roseum* fue citado como productor de biodiesel (Strobel *et al.*, 2008). Por otra parte *Guignardia*, *Aspergillus*, *Curvularia* y *Trichoderma* son otros géneros aislados de hojas y tallos de yerba mate con menor frecuencia que los géneros anteriores, todos fueron citados tanto como patógenos en caso de *Curvularia*, saprófitos en caso de *Aspergillus* y *Trichoderma*, como también endófitos. Esto sugiere la posibilidad de que en

yerba mate podrían ser endófitos que están esporádicamente siendo capaces de proteger a las plantas contra los fitopatógenos de yerba, como ha sido mencionado en otros trabajos (Arnold, 2003).

Entre las bacterias aisladas de yerba mate, Actinobacteria fue el taxón más abundante, en particular el género *Curtobacterium* y *Microbacterium*. Resultados similares han sido reportados en varias plantas huéspedes (Zinniel *et al.*, 2002; Thomas, 2006; Magnani *et al.*, 2010; Gagne-Bourgue *et al.*, 2013). La endósfera de plantas es un hábitat común de actinobacterias, en el cual las bacterias muestran diferente grado de diversidad funcional y genética. Ellas juegan un rol importante para la planta huésped por producción de elevadas cantidades de catabolitos y compuestos promotores de crecimiento (Araújo *et al.*, 2002; Lacava *et al.*, 2007; El-Shatoury *et al.*, 2013; Brader *et al.*, 2014). *Curtobacterium* fue aislada como endófito de cultivos de importancia agronómica (maíz, sorgo, soja y trigo) (Zinniel *et al.*, 2002) y como bacteria característica de la filósfera de álamo (Behrendt *et al.*, 2002), también se han encontrado especies con funciones como controladores biológicos (Lacava *et al.*, 2007) y como fitoremediadora (Moore *et al.*, 2006). Estos géneros encontrados tanto en hoja como en tallos en plantas de yerba mate demuestran ser endófitos ubicuos en la especie.

Otras bacterias frecuentemente encontradas fueron las Alphaproteobacterias, *Methylobacterium* y *Sphingomonas*. Especies del género *Methylobacterium* han sido reportadas como endófitos en varias especies de plantas tales como *Citrus* spp. (Araújo *et al.*, 2002), *Eucalyptus* sp. (Ferreira *et al.*, 2008), *Coffea arabica* y *Capsicum annuum* (Dourado *et al.*, 2012). Entre ellos, *Methylobacterium nodulans* está involucrada en la fijación de nitrógeno, así como algunas especies de *Sphingomonas* (Sy *et al.*, 2001; Videira *et al.*, 2009). Otras especies de *Methylobacterium* han demostrado inducir el sistema de resistencia en arroz y maní (Madhaiyan *et al.*, 2004; 2006).

Los resultados logrados en este trabajo constituyen la base que permitirá continuar con investigaciones tendientes a dilucidar aspectos de la relación planta/endófito. La obtención de una colección numerosa de hongos y bacterias endofíticos identificados y conservados correctamente permitirá futuros estudios tales como la localización y movimiento de endófitos dentro de la planta, sus funciones frente a patógenos como controladores biológicos o frente a las plantas como promotores del crecimiento. Así mismo la influencia de bacterias y hongos sobre la calidad alimentaria de las hojas y



tallos de yerba mate, principalmente en relación con las micotoxinas producidas por el género *Fusarium*, género predominante en este trabajo.

## CONCLUSIONES

A partir del análisis de la población de microorganismos endofíticos en plantas de yerba mate crecidas a campo y en invernáculo y el análisis de contaminantes en cultivo *in vitro* se constataron varias evidencias:

- ✓ La mayoría de los contaminantes en cultivo *in vitro* son microorganismos endofíticos presentes en plantas crecidas a campo o en invernáculo que no afectan negativamente el crecimiento en condiciones *ex vitro*.
- ✓ El número de aislamientos y diversidad de hongos y bacterias están influenciados por la época de muestreo, son mayores en otoño y verano.
- ✓ El número de aislamientos y diversidad de hongos y bacterias no están influenciados por el genotipo en la situación del experimento realizado.
- ✓ El número de aislamientos y diversidad de hongos y bacterias está influenciado por el tipo de órgano vegetal y su edad.
- ✓ Se determinaron las fuentes (campo, invernadero o ambiente de trabajo) de los géneros de hongos y bacterias.
- ✓ Tres especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum* y *F. subglutinans*) pueden ser endófitos en plantas crecidas en el campo y patógenos en el cultivo *in vitro* de yerba mate (vitropatógenos).

A modo de síntesis, se presenta una tabla que muestra los géneros de hongos y bacterias que se han encontrado en las tres condiciones de crecimiento, y los que sólo se encontraron en una o dos.



**Tabla 17:** Presencia (X) y ausencia de géneros de hongos y bacterias endofíticos aislados de plantas de yerba mate crecidas en el campo, en invernadero y/o en cultivo *in vitro*.

	<b>Géneros</b>	<b>Campo</b>	<b>Invernáculo</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i></b>
H	<i>Alternaria</i>	X		X
	<i>Aspergillus</i>	X		
	<i>Cercospora</i>	X		
	<i>Colletotrichum</i>	X		
O	<i>Curvularia</i>	X	X	X
	<i>Fusarium</i>	X	X	X
N	<i>Gliocladium/Bionectria</i>	X		
	<i>Guignardia/Phyllosticta</i>	X		
G	<i>Microsphaeropsis</i>	X		
	<i>Neofusicoccum</i>	X		
O	<i>Nigrospora</i>	X		
	<i>Paecilomyces</i>	X		
S	<i>Penicillium</i>	X	X	X
	<i>Phomopsis/Diaporthe</i>	X		
	<i>Setophoma</i>	X	X	X
	<i>Trichoderma</i>	X		
B	<i>Aeromicrobium</i>	X		
	<i>Bacillus</i>	X	X	
A	<i>Brevundimonas</i>	X		
	<i>Curtobacterium</i>	X		
C	<i>Herbiconiux</i>	X		
	<i>Janibacter</i>	X		X
T	<i>Kineococcus</i>	X		
	<i>Leucobacter</i>	X		
E	<i>Lysinibacillus</i>	X		
	<i>Methylobacterium</i>	X		
R	<i>Microbacterium</i>	X		
	<i>Micrococcus</i>	X		
I	<i>Mycobacterium</i>	X		
	<i>Paenibacillus</i>	X		
A	<i>Pantoea</i>	X	X	X
	<i>Phenylobacterium</i>	X		
S	<i>Rhizobium</i>	X		
	<i>Roseomonas</i>	X		
	<i>Sphingomonas</i>	X		
	<i>Staphylococcus</i>	X	X	X
	<i>Xylophilus</i>	X		

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta M, Caballero I, Alvarado Y, Leiva M (2002). Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L). *Biología vegetal* 2: 67-71.
- Alippi AM, Aguilar OM (1998). Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 21-27.
- Al-Mayahi AM, Ahmed AN, AlKhalifa AA (2010). Isolation and identification of associated fungi with the micropropagation of five different date palm cultivars and the effect of Benlate fungicides in their control. *Basrah Journal For Date Palm Research* 9:79-97.
- Almeida TT, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA (2015). Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 14: 4920-4931.
- Amann R, Kühn M (1998). In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology* 1: 352-358.
- Araújo WL, Marcon J, Maccheroni Jr. W, van Elsas JD, van Vuurde JW, Azevedo JL (2002). Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied Environmental Microbiology* 68: 4906-4914.
- Arnold AE (2003). Fungal endophytes limit pathogen in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 100: 15649-15654.
- Azevedo JL (1998). Microorganismos Endofíticos. *Ecología Microbiana*. 4: 117-137.
- Bacon CW, Hinton DM (2006). Bacterial Endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. En: Gnanamanickam, SS (ed.) *Plant-Associated Bacteria*. Springer. The Netherlands 155-194.
- Bacon CW, Glenn AE, Hinton D (2002). Isolation, in plant detection and culture of endophytic bacteria and fungi. En: Hurst, CJ, Knudsen, G, McInerney, M, Walter, MV, Stetzenbach, LD (eds.) *Manual of environmental microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press Washington DC 543-553.



- Bailey JA, Jeger MJ (1992). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 388pp.
- Bangera MG, Thomashow LS (1996). Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 9: 83-90.
- Bartholdy BA, Berreck M, Haselwandter K (2001) Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *BioMetals*, 14: 33–42.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Naumann D, Suzuki K (2002). Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov., and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1441-1454.
- Bernasconi NK, Mroginski LA, Sansberro PA, Rey HY (1996). Micropropagación de la yerba mate (*Illex paraguariensis* St. Hil.): efecto del genotipo y de la época del año en el establecimiento *in vitro* de los explantes. *Phyton* 58: 23-31.
- Blumer C, Haas D (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives Microbiology* 173: 170–177.
- Bowman KO, Hutcheson K, Odum EP, Shenton LR (1971). Comments on the distribution of indices of diversity. En: Patil GP, Pielou EC, Waters WE (eds.), *Statistical Ecology*, 3. Pennsylvania State University Press, University Park: 315–359.
- Bradbury JF (1970). Isolation and Preliminary study of bacteria from plants. *PANS Pest Articles & News Summaries*. 16 (4): 632-637.
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30–37.
- Braun U, Rybak M, Rybak R, Cabrera MG (2012). Foliar diseases on tea and maté in Argentina by *Pseudocercospora* species. *Plant Pathology & Quarantine* 2(2): 103-110.



- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW (2001). *The Fungi* 2nd Edition Academic Press, London 608 pp.
- Carroll, GC (1978). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2–9.
- Cassells AC (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. En: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands 31-44.
- Cassells AC (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. En: Loyola-Vargas MV, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press. 877: 57-80.
- Cenis JL (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20: 9.
- Christensen M, Frisvad JC, Tuthill DE, Samson RA, Pitt JI (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers 309-320.
- Cohen SD (2006). Host Selectivity and Genetic Variation of *Discula umbrinella* Isolates from Two Oak Species: Analyses of Intergenic Spacer Region Sequences of Ribosomal DNA. *Microbial Ecology* 52: 463-469.
- Collado J, Platas G, González I, Peláez F (1999). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytology* 144: 525–532.
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (2010). Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* 46:727–738
- Danhorn T, Fuqua C (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61: 401–22.
- De Bary A (1866). *Morphologie and Physiologie der Pilze, Flechten and Myxomyceten*, Holfmeister's Handbook of Physiological Botany. Germany: Leipzig Vol. 2.



- De Winnaar, W (1997). Micropropagation of *Carica papaya* L. Journal of the American Society for Horticultural Science. 156: 735-738.
- Debergh, PC, Read, PE (1991). Micropropagation. En: Debergh, PC, Zimmerman RH (eds) Micropropagation Technology and Application, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1–13.
- Deng BW, Liu KH, Chen WQ, Ding XW, Xie XCh (2009). *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 139-143.
- Dhingra OD, Sinclair JB (1986). Culture of pathogens. En: Dhingra OD, Sinclair JB (Eds.) Basic Plant Pathology Methods. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Lewis Publishers 2: 11-45.
- Dianese AC, Vale HMM, Souza ÉSC, Pereira-Carvalho RC, Chaves ZM, Câmara PEAS, Dianese JC (2014). New *Cercospora* species on *Jatropha curcas* in central Brazil. Mycological Progress 13: 1069-1073.
- Dias ACF, Costa FEC, Andreote FD, Lacava PT, Teixeira MA, Assumpção LC, Araújo WL, Azevedo JL, Melo IS (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 189-195.
- Dolce NR, Mroginski LA, Rey HY (2010). Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) seed germination Seed Science and Technology 38: 441-448.
- Dourado MN, Andreote FD, Andreote FD, Conti R, Araújo JM, Araújo WL (2012). Analysis of 16S rRNA and *mxoF* genes revealing insights into *Methylobacterium* niche-specific plant association. Genetics and Molecular Biology. 35: 142-148.
- Dutra LF, Dias Gomes da Silva, N (2009) Estabelecimento *In Vitro* de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa Clima Temperado Comunicado Técnico 215, 7 pp.
- El-Shatoury SA, El-Kraly OA, Trujillo ME, El-Kazzaz WM, El-Dina ESG, Dewedara A (2013). Generic and functional diversity in endophytic actinomycetes from wild Compositae plant species at South Sinai – Egyptian Research in Microbiology 164: 761–769.



- Espinosa-García FJ, Langenheim JH (1990). The Endophytic Fungal Community in Leaves of a Coastal Redwood Population - Diversity and Spatial Patterns. *New Phytologist*. 116: 89-97
- Felske A, Wolterink A, van Lis R, de Vos WM, Akkermans ADL (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 137-145.
- Ferreira A, Quecine MC, Lacava PT, Oda S, Azevedo JL, Araújo WL (2008). Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letter* 287: 8-14.
- Filip R, López P, Giberti GC, Coussio J, Ferraro G (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72: 774-778.
- Fischer IH, Rezende JAM (2008). Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technology Global Science Books* 2: 1-19.
- Fowler JAP, Sturion JA (2000). Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. *Comunicado Técnico (INFOTECA-E)* 45:1-5.
- Frisvad JC, Samson RA (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of the food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies Mycology* 49:1-174.
- Gagne-Bourgue F, Aliferis KA, Seguin P, Rani M, Samson R, Jabaji S (2013). Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switch grass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Journal of Applied Microbiology* 114: 836-853.
- Gaur A, Adholey A (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86: 528-34
- Geiser DM, Jiménez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.



- Giberti GC (1994a). Aquifoliaceae. En: R. Spichiger y L. Ramella (Eds.), Flora del Paraguay, Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Missouri Botanical Garden, Héliographia S A, Geneva, Switzerland. Vol. 24
- Gond SK, Verma VC, Kumar A, Kumar V, Kharwar RN (2007). Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). World Journal Microbiology Biotechnology 23: 1371–1375.
- Göre ME, Bucak C (2007). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. Forest Pathology 37, 281–288.
- Gortari J (1998). El Mercosur y la economía yerbatera. Una aproximación al impacto de la pequeña producción regional. Realidad Económica. Instituto Argentino para el Desarrollo Económico. 154
- Graham PH, Sadowski MJ, Keyser HH, Barnet YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley DJ, Jarvis BDW, Roslicky EB, Strijdom BW, Young JPW (1991). Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 582-587.
- Grigoletti Junior, A, Auer, CG, Maschio, LMA (1996). Doencas em erva mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) na região sul do Brasil. Parte do Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n.32/33:43-51.
- Guarro J, Gene J. (1995). Opportunistic fusarial infections in humans. European journal of clinical microbiology and infectious diseases 14: 741-754.
- Guo LD, Huang GR, Wang Y (2008). Seasonal and time age influences on endophytic fungi of *Pinus tabuliformis* (Pinaceas) in the Dongliny Mountains, Beijin. Journal of Integrative Plant Biology 50: 997-1003.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895-914.





- Hamayun M, Afzal Khan S, Ahmad N (2009). *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 627–632.
- Hameed MA, Abass MH. (2006). Study of cytological changes associated with contaminated date palm *Phoenix dactylifera* L. tissue cultures with fungi. Basrah Research Journal. 32: 1- 27.
- Hanada RE, Pomella AWV, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. Fungal Biology 114: 901-910.
- Hassan, HAH (2002). Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Rostlinná Výroba 48: 101–106.
- Hata K, Futai K (1995). Endophytic Fungi Associated with Healthy Pine Needles and Needles Infested by the Pine Needle Gall Midge, *Thecodiplosis Japonensis*. Canadian Journal and Botany.73: 384-390
- Hinton DM, Bacon CW (1996). Symptomless Endophytic Colonization of Maize by *Fusarium moniliforme*. Canadian Journal of Botany. 74: 1195-1202.
- Hirano SS, Upper CD (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Review. 64: 624-653.
- Hu CY (1975). *In vitro* culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. Journal of the American Society for Horticultural Science 100: 221–225.
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, van Montagu M, Kellenberger E (1994). Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. Journal Bacteriology 176: 1913–1923.
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Molecular Plant-Microbe Interactions 15: 233-242.



- Iniguez AL, Dong Y, Triplett EW (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1078-1085.
- Jalgaonwala RE, Mohite BV, Mahajan RT (2011). A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1: 21-32.
- Kamout R, Lepoivre P, Boxus P (1997). Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus cerasus* cv. 'Montmorency'. En: Cassells, AC (Ed.) *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands 145-148.
- Kharwar RN, Gond SK, Kumar A, Mishra A (2010). A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 1941-1948.
- Kim ChK, Eo JK, Eom AH (2013) Diversity and Seasonal Variation of Endophytic Fungi Isolated from Three Conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology* 41:82-85
- Kjøller R, Rosendahl S (2000). Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* 226: 189–196.
- Kobayashi DY, Palumbo JD (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. En: Bacon CW, White JF (Eds.) *Microbial endophytes*. 199–236.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6: 1244–1251.
- Kuldau GA, Yates, IE (2000). Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. *Microbial endophytes* 85-117.
- Kvacek Z, Teodoridis V, y Wang Q (2009). "*Ilex geissertii* sp n. (Aquifoliaceae), a fossil ancestor of *Ilex* sect. *Ilex* in the upper Miocene and Pliocene of Europe." *Review of Palaeobotany and Palynology* 157: 192-210.



- La Mondia JA, Taylor GS (1987). Influence of the tobacco cyst nematode (*Globodera tabacum*) on Fusarium wilt of Connecticut broadleaf tobacco. *Plant Disease* 71: 1129–1132.
- Lacava PT, Li W, Araújo WL, Azevedo JL, Hartung JS (2007). The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *The Journal of Microbiology* 45: 388-393
- Leifert C, Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37: 133-138.
- Leifert C, Waites WM, Camotta H, Nicholas JR (1989). *Lactobacillus plantarum*; a deleterious contaminant of plant tissue. *Systematic and Applied Microbiology* 67: 363-370.
- Leifert C, Morris CE, Waites WM (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: Reasons for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-183.
- Leslie JF, Summerell AB (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing Professional. 388 pp.
- Loizeau PA, Barreira G, Manen JF, Broennimann O. (2005). Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a World-wide scale. *Biologiske Skrifter* 55: 501-520.
- Luna C (2010). Tesis para optar del título doctora en el área de Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Automatización de la Micropropagación de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*: Estudio del Intercambio Gaseoso, Estado hídrico y Fotosíntesis durante las Etapas de Aclimatación y Post-Aclimatación
- Luna C, Collavino M, Mroginski L, Sansberro P (2008). Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:13-19.
- Luna C, Acevedo R, Collavino M, Gonzalez A, Mroginski L, Sansberro P (2013). Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 49: 326-332.
- Lysiak E (2010). El sistema agroindustrial de la yerba mate. Documento de trabajo-INTA. 1-96.



- MacArthur DJ, McGee PA (2006). A comparison of the endophytic fungi from leaves of *Banksia integrifolia* at three sites on the east coast of Australia. *Australasian Mycologist* 19: 80-83.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung H, Yang J-C, Sundaram S, Sa TM (2004). Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* sp. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei* 45: 315–324.
- Madhaiyan M, Suresh Reddy BV, Anandham R, Senthilkumar M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Sa T (2006). Plant Growth–Promoting *Methylobacterium* Induces Defense Responses in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Compared with Rot Pathogens. *Current Microbiology* 53: 270-276
- Madigan MT (2000). The family *Heliobacteriaceae*. En: Garrity G (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, N.Y: Springer 1: 615–620.
- Magnani GS, Didonet CM, Cruz LM, Picheth CF, Pedrosa FO, Souza EM (2010). Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research* 9: 250-258.
- Malinowski DP, Alloush GA, Belesky DP (2000). Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant and Soil* 227: 115-126.
- Manen JF, Boulter MC, Naciri-Graven Y (2002). The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Systematics and Evolution* 235: 79-98.
- Martin KJ, Rygiewicz PT (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28.
- Martínez Molina C, Ortiz Mendoza D, Ogura T, Beltrán García MJ. (2010) Microorganismos endófitos ¿amigos o enemigos de las plantas?. *Revista Ciencia y Desarrollo* 36: 6-11.
- Mayol RM, Giancola SI, Lavecini MV, Aiassa JF, Di Giano S, Salvador ML, Da Riva M, Acuña DO, Rabaglio MD (2014). Causas que afectan la adopción de tecnología en productores de yerba mate en la provincia de Misiones: enfoque cualitativo. *Estudios socioeconómicos de la adopción de tecnología*, Buenos Aires:Edición INTA. 08: 74pp.



- McCully ME (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australasian Journal of Plant Physiol* 28:983–990.
- Medeiros, AC de S. (1998) Dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Colombo: EMBRAPA-CNPQ 25pp.
- Melnick RL, Suárez C, Bailey BA, Backman PA (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control* 57: 236–245.
- Menna AB (1995) Proposta para ação extensionista na cultura da erva-mate. En: Winge H, Ferreira AG, Mariath De A JE, Tarasconi, LC (Eds.), org. Erva-mate: biologia e cultura no cone sul. Porto Alegre: Ed. da UFRGS. 235-239.
- Milosavljević A, Pfaf-Dolovac E, Mitrović M, Jović J, Toševski I, Duduk N, Trkulja N (2014). First report of *Cercospora carotae*, causal agent of cercospora leaf spot of carrot, in Serbia. *Plant Disease* 98: 1153.
- Mitchell JI, Zuccaro A (2006). Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20: 62–74.
- Mocali S, Bertelli E, Di C, Mengoni A, Sfalanga A, Villani F, Caciotti A, Tegli SSG (2003). Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology* 154: 105–114.
- Montesinos E (2003). Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *International Microbiology* 6: 221-223.
- Moore FP, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, Van der Lelie D, Campbell CV, Moore ER (2006). Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 539-56.
- Mroginski LA, Bernasconi NK, Sansberro PA, Rey HY (1996). Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. *Phyton* 59: 161-170.



- Mroginski LA, Sansberro P, Rey H, Collavino M (1997). Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Estado actual y perspectivas. I Congreso Sul-Americano Da Erva-Mate, II Reunión técnica Do cone Sul sobre a cultura Da erva-mate. Curitiba, PR, Brasil 139-151.
- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E y Mroginski A (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, Argentina 17-25.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nair D, Padmavathy S (2014). Impact of Endophytic Microorganisms on Plants Environment and Humans. Review Article. *The Scientific World Journal* 1-11.
- Nath R, Sharma GD, Barooah M (2012). Efficiency of tricalcium phosphate solubilization by two different endophytic *Penicillium* sp. isolated from tea (*Camellia sinensis* L.). *European Journal of Experimental Biology* 2: 1354–1358.
- Nayak BK (2015). Comparative assessment of two methods for isolation of endophytic fungi from varied leaves of *Andrographis paniculata*. *International Journal of ChemTech Research* 7: 2085-2089.
- Nelson SC (2008). Cercospora Leaf Spot and Berry Blotch of Coffee. *Plant Disease* 41: 1-6.
- Niedz RP, Bausher MG (2002). Control of *in vitro* contamination of explantes from greenhouse and field-house and trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38:468–471.
- Niklas CO (1987). Estudios embriológicos y citológicos en la Yerba Mate, *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Bonplandia* 6: 45-56.
- Nilsson RH, Kristiansson E, RybergM, Hallenberg N, Larsson K-H (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193–201.



- Osono T (2008). Endophytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age dependent variations. *Mycologia* 100: 387-391.
- O' Sullivan DJ, O' Gara F (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*. 56: 662–676.
- Park MS, Fong JJ, Oh SY, Kwon KK, Sohn JH, Lim YW (2014). Marine-derived *Penicillium* in Korea: diversity, enzyme activity, and antifungal properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106: 331–345.
- Partida-Martínez L, Heil M (2011). The microbe-free plant: fact or artifact? Review article. *Frontiers in Plants Science*. 2: 1-15.
- Pimentel IC (2006). Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta* 36: 123-8
- Pirttilä A, Joensuu P, Pospiech H, Jalonen J, Hohtola A (2004). Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiologia Plantarum* 121: 305–312.
- Pirttilä AM, Pospiech H, Laukkanen H, Myllylä R, Hohtola A (2005). Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. *Tree Physiology* 25: 289-297.
- Poletto I, Brião Muniz MF, Ceconi DE, Santin D, Deconto Weber MN, Blume E (2006). Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. *Ciência Florestal* 16: 1-10.
- Porras-Alfaro, A, Bayman, P (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review Phytopathol.* 49: 291-315.
- Prat Kricun SDP (1993). Yerba mate: técnicas actualizadas de cultivos . Cerro Azul, Argentina: Inta 13p. (Inta. Miscelanea, 27)



- Qadri M, Johri S, Shah BA, Khajuria A, Sidiq T, Lattoo SK, Abdin MZ, Riaz-Ul-Hussain S (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. Springer Plus 2: 8.
- Rademaker JLW, de Bruijn FJ (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews, pp. 151–171.
- Radhakrishnan R, Shim KB, Lee BW, Hwang CD, Pae SB, Park CH, Kim SU, Lee CK, Baek IY. (2013) IAA producing *Penicillium* sp. NICS01 triggers plant growth and suppresses *Fusarium* sp.-induced oxidative stress in sesame (*Sesamum indicum* L.). Journal Microbiology Biotechnology 23: 856–863.
- Ramírez M, Isea F, Santos R, León de Sierralta S, Urdaneta A, (2005). Hongos contaminantes en el cultivo *in vitro* de apices de plantas adultas de *Annona muricata* tratados con hipoclorito de sodio, en el estado Zulia Venezuela. En: Acosta M (Ed.). Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. Manejo integrado de plagas y agroecología. 75: 60-63.
- Rasmussen SD, DuPlissis JG (1999). NF99-396 Prevention and Control of Cercospora Needle Blight Disease in Junipers and Cedars. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension. Paper 889. <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/889>
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. Science. 298: 1581
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998). Life in fasses: diazotrophic endophytes. Trends in Microbiology 6: 139-144.
- Rey HY, Sansberro PA, Collavino MM, Daviña JR, Gonzalez AM, Mroginski LA (2002). Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Euphytica 123: 49-56
- Rivera-Orduña FN, Suarez-Sanchez RA, Flores-Bustamante ZR, Gracida-Rodriguez JN, Flores-Cotera JB (2010). Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew) Fungal Diversity 47: 65-74





- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant and Microbe interaction* 19: 827-837.
- Rossmann AY, Farr DF, Castlebury LA (2007). A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48: 135-144.
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araújo WL, dos Santos DR, Azevedo JL (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Science* 1: 24-33.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4927-32.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander ML, Sullivan TJ (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Sansberro PA, Rey HY, Mroginski LA, Collavino MM (1998). *In Vitro* Culture of Rudimentary Embryos of *Ilex paraguariensis*: Responses to Exogenous Cytokinins. *Journal of Plant Growth Regulation* 17:101–105.
- Sansberro PA, Rey HY, Mroginski LA, Collavino MM (1999) *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *In Vitro Cellular and Development Biology Plant* 35: 401-402.
- Sansberro PA, Rey HY, Bernardis A, Luna C, Collavino M, Mroginski LA (2000). Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. *Biocell* 24: 53-63.
- Sansberro PA, Rey HY, Mroginski LA, Krivenki MA (2001). Plant regeneration from *Ilex spp.* (Aquifoliaceae) *in vitro*. *Biocell* 25: 139-146.
- Sansberro PA, Rey HY, Mroginski LA (2001). *In Vitro* Culture of Zygotic Embryos of *Ilex* Species. *Hort Science*. 36: 351–352.



- Schinella GR, Fantinelli C, Mosca SM (2005) Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clinical Nutrition* 24: 360-366.
- Scholtysik A, Unterseher M, Otto P, Wirth C (2013). Spatio-temporal dynamics of endophyte diversity in the canopy of European ash (*Fraxinus excelsior*) *Mycological Progress* 12: 291-304.
- Schulz B, Boyle C (2005). What are endophytes? En: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds.) *Microbial Root Endophytes*, Springer-Verlag, Berlin, 1–13.
- Schulz B, Rommert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D (1999). *Mycological Research* 105: 1275-1283
- Sedlář J, Sedlářová M, Flusser J (2009). Image processing methods for determination of downy mildews from light microscopy images. En: Kulpa K, Kaska W (eds) *Signal Processing Symposium Proceedings*. Warsaw: Warsaw University of Technology.
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif-minus mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(3), 358–366.
- Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martinez-Romero E (2002). Advances in Rhizobium research. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 323–378.
- Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, Salati F, Duarte MCT (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1185-1195.
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif-minus mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 358–366.



- Shiono Y, Tsuchinari M, Shimanuki K, Miyajima T, Murayama T, Koseki T, Laatsch H, Funakoshi T, Takanami K, Suzuki K (2007). Fusaristatins A and B, Two New Cyclic Lipopeptides from an Endophytic *Fusarium* sp. *The Journal of Antibiotics* 60: 309–316.
- Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Oullette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, Schwab P, Greer CW (2001). Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2469–75.
- Silvaa HSA, Tozzib JPL, Terrasanc CRF, Bettiolb W (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control* 63: 62-67.
- Simpson EH (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR, Christensen JH (2010). Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81: 1084–1090
- Souchie, E. L., Azco, R., Barea, J. M., Saggin-Junior, O. J., Silva, E. M. R. (2006): Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41: 1405–1411.
- Stone JK, Bacon CW, White JF (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En: Bacon CW, White JF (Eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York 3-30
- Strobel GA, Knighton B, Kluck K, Ren Y, Livinghouse T, Griffin M, Spakowicz D y Sears J (2008). The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* 154: 3319-3328.
- Sturion JA (1988) Produção de mudas e implantação de povoamento com erva-mate. Curitiba: EMBRAPA-CNPF. Circular técnica 17: 10.
- Sturz AV, Christie BR, Nowak J, (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19: 1-30.



- Sun X, Ding Q, Hyde KD, Guo LD (2012). Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal ecology* 5: 624-632.
- Suryanarayanan TS, Vijaykrishna D (2001). Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity* 8: 155-161.
- Suryanarayanan TS, Murali TS, Thirunavukkarasu N, Govinda Rajulu MB, Venkatesan G, Sukumar R (2011). Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodivers Conserv* 20: 913-928.
- Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B (2001). Methylophilic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731 - 2739.
- Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, Guo SX, Zhao LF (2012) Isolation and Identification of Endophytic Fungi in Roots of Nine *Holcoglossum* Plants (Orchidaceae) Collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan Provinces of China. *Current Microbiology*. 64 : 140-147.
- Tello JC, Lacasa A Bol (1988). "La podredumbre del cuello y de las raíces", causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. *Sanidad Vegetal Plagas* 14: 307-312.
- Thomas P (2004). A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Science* 87: 67-72.
- Thomas P (2006). Isolation of an ethanol-tolerant endospore-forming Gram-negative *Brevibacillus* sp. as a covert contaminant in grape tissue cultures. *Journal Applied Microbiology* 101: 764-774.



- Thomas P, Swarna GK, Patil P, Rawal RD (2008) Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 39–54.
- Van Delm T, Van Beneden S, Mommaerts V, Melis P, Stoffels K, Wäckers F, Baets, W (2015). Control of *Botrytis cinerea* in strawberries with *Gliocladium catenulatum* vectored by bumblebees. *Journal of Berry Research* 5: 23-28.
- Van Niekerk JM, Van Niekerk JZ, Farr DF, Fourie PH, Halleer F, Crous PW (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology* 34 : 27-39.
- Versalovic J., Lupski R. (2002). Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* 10: 15-21.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823 – 6831.
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn F, Lupski J (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25–40.
- Videira SS, De Araujo JLS, Da Silva Rodrigues L, Baldani VLD, Baldani JI (2009). Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiology Letters* 293: 11–19.
- Vílchez G, Alonso G (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29: 6-12.
- Viljoen A, Wingfield MJ, Marasas WFO (1994). First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Journal Plant Disease* 78: 309-312.
- Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Lee IJ (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules* 17: 10754-10773.



- 
- Wakelin SA, Anstis ST, Warren RA, Ryder MH (2006). The role of pathogen suppression on the growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. *Australasian Plant Pathology* 35: 253–258.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697–703.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and T.J. White (eds). Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322
- Xin G, Zhang G, Kang JW, Staley JT, Doty SL (2009). A diazotrophic, indole-3-acetic acid-producing endophyte from wild Cottonwood. *Biology and Fertility of Soils*. 45: 669–674.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarsk D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2198-2208.
- Zum Felde A, Pocasangre LE, Monteros Carñizares CA, Sikora RA, Rosales FE, Riveros AS (2006). Efecto de inoculaciones combinadas de hongos endofíticos en el biocontrol de *Radopholus similis*. *InfoMusa* 15: 12-18.

**ANEXO**



## Capítulo II

### Agar Papa Glucosado (APG) (comercial: Britania)

APG 49g

H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub> 1000 ml

### Papa Glucosado (PG)

Papa 50 g

Glucosa 20 g

H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub> 1000 ml

### Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g

KNO<sub>3</sub> 1 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g

KCl 0,5 g

Glucosa 0,2 g

Sacarosa 0,2 g

Agar-Agar 20 g

H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub> 1000 ml

### Tallos de soja estériles sobre corn meal agar (CMA)

Harina de maíz 30 g

Agar 20 g

H<sub>2</sub>O<sub>destilada</sub> 1000 ml





Tallo de soja

### Agar Triptona de Soja (TSA)

Triptona	15 g
Peptona de Soja	5 g
NaCl	5 g
Agar-Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>destilada</sub>	1000 ml

pH 7,3

### Tampón Tris/EDTA

Tris HCl pH 7,5 1M	1 ml
EDTA 0,5M	200 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura	99 ml

### Tampón TBE 5X

Tris Base	27 g
Ácido Bórico	13,75 g
EDTA 0,5M pH 8	10 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura	90 ml



## TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

### Relacionados al tema de tesis

Pérez ML, Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Galdeano E (2016). **Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in *Ilex paraguariensis* grown under field conditions**. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 32:61

### No relacionados al tema de tesis

Molina SP, Pérez ML, Rey HY, Mroginski LA (2013). Regeneración de plantas de té (*Camellia sinensis*) por cultivo *in vitro* de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales. Rev. FCA UNCUYO 45(1): 127-134.

Molina S, Pérez M, Rey H, Mroginski L (2014). Técnicas de cultivo *in vitro* y almacenamiento a baja temperatura para la conservación de explantes de té. Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales. Año 4 N° 6.

## TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS

### Relacionados al tema de tesis

Pérez, ML, Galdeano E, Mroginski LA. Detección de Microorganismos Contaminantes en el Establecimiento *in vitro* de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). XX Reunión de comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Resistencia, Chaco. Argentina. Junio de 2014

Pérez ML, Paredes E, Cúndom MA, Galdeano E, Mroginski LA. Detección de Microorganismos Contaminantes en el Establecimiento *in vitro* de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). 3° Congreso Argentino de Fitopatología. AAF. San Miguel de Tucumán. Argentina. Junio de 2014.

Pérez, ML, Galdeano E, Mroginski LA. Diversidad de Bacterias y Hongos endofíticos en Cultivos de Yerba Mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. XIX Reunión de comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Resistencia, Chaco. Argentina. Junio de 2013.

Pérez ML, Collavino MM, Galdeano E, Sansberro P, Mroginski LA. Diversity of endophytic bacteria isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves and stems. VIII Congreso Argentina de Microbiología General. SAMIGE. Mar del Plata, Bs. As. Argentina. Julio de 2012

Pérez ML, Barreto D, Galdeano E y Mroginski LA. Hongos asociados a tallos y hojas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) como probables contaminantes de cultivos *in vitro*. 2° Congreso Argentino de Fitopatología. AAF. Mar del Plata, Bs. As. Argentina. Junio de 2011



## **No relacionados al tema de tesis**

Molina S, Pérez ML, Rey H, Mroginski LA. Crioconservación de ejes embrionales de dos clones de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seleccionados en Argentina. XXI Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión. FCA - UNNE. Corrientes. Argentina. Agosto de 2010.

Molina S, Pérez, ML, Rey H, Mroginski LA. Efecto de la deshidratación de explantes en la crioconservación de dos clones de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seleccionados en Argentina. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. La Plata. Argentina. Septiembre de 2009.

Pérez ML, Galdeano E, Mroginski LA. Embriogénesis somática a partir de cotiledones de Té (*Camellia sinensis*). XV Reunión de comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Resistencia, Chaco. Argentina. Junio de 2009.

## **CURSOS DE POSGRADO**

### **Relacionados con el tema de tesis**

- Extending and Enhancing DNA Barcoding Research un Argentina and Neighboring Countries: Sixth Leading Labs Training Workshop. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinador: Dr. Pablo Tubaro. Lugar: Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina. Fecha: 2 al 6 de Junio de 2014.
- Extending and Enhancing DNA Barcoding Research un Argentina and Neighboring Countries: Fifth Leading Labs Training Workshop. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinador: Dr. Pablo Tubaro. Lugar: Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina. Fecha: 20 al 24 de Mayo de 2013.
- Métodos de Análisis Multivariado. Teórico-práctico (60 horas de duración). Coordinadora: Dra. María Mercedes Avanza. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 13 al 20 de agosto 2011.
- Introducción al uso de ácidos nucleicos de Hongos. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinador: Dr. Sebastián Stenglein. Lugar: Facultad de Agronomía de Azul, Azul (Pcia. de Bs. As.). Fecha: 22 al 26 de marzo de 2010.
- Mejoramiento Genético Vegetal. Teórico-práctico (30 horas de duración). Coordinador: Dr. Guillermo Normann. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 2010.



- Control Integrado de plagas y Enfermedades, Teórico (30 horas de duración). Coordinador: Ing. Agr. José Tarragó. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 26 al 31 de Julio de 2010
- Introducción al uso de marcadores moleculares. Teórico-práctico (30 horas de duración). Coordinador: Dr. Eric J. Martínez. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 12 y el viernes 16 de abril de 2010.
- Biología Molecular. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinador: Dr. Francisco Espinoza. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 2009.
- Interacción Planta-Microorganismo. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinadora: Dra. Mónica Collavino. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 14 y 26 de septiembre de 2009.
- Protección Vegetal. Teórico-práctico (60 horas de duración). Coordinadora: Dra. Ernestina Galdeano. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: primer modulo 14 al 17 de abril y segundo módulo del 16 al 19 de junio de 2009.
- Relación Suelo-Planta. Teórico (40 horas de duración). Coordinadora: Dra. Sara Vázquez. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 18 al 23 de mayo de 2009.
- Ecología. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinadora: Dra. Viviana Solís Neffa. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 2009.
- Ecofisiología. Teórico-práctico (40 horas de duración). Coordinadora Ing. Agr. Patricia Angeloni. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 30 de marzo al 4 de abril y del 20 al 25 de 2009.
- Metodología de la Investigación. Teórico-práctico (80 horas de duración). Coordinador: Dr. Pedro Sansberro. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 03 al 07 de marzo de 2008
- Bioquímica. Teórico (40 horas de duración). Coordinadora: Dra. Laura Leiva, lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 07 al 12 de abril de 2008.
- Bioestadística y Diseño Experimental. Teórico-práctico (80 horas de duración). Coordinadora: Dra. Silvia Mazza. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 19 al 23 de mayo y del 2 al 6 de junio de 2008.
- Agroclimatología. Teórico (30 horas de duración). Coordinador: Dr. Juan Prause. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: 25 al 29 de agosto
- Genética Vegetal. Teórico (40 horas de duración). Coordinador: Dr. Camilo Quarín. Lugar: Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Fecha: noviembre de 2008.



## **Relacionados con docencia**

Inglés Académico: Lectura de textos y redacción de Abstracts. Teórico-práctico (30 horas de duración). Profesora dictante: Mariana Boari. Lugar: FACENA-UNNE. Fecha: 2015.

El currículum en el Aula de Ciencias: diseño, desarrollo y evaluación de unidades didácticas en ciencias experimentales. Teórico-práctico (30 horas de duración). Profesor dictante: Dr. Héctor Odetti. Lugar: FACENA-UNNE. Fecha: 2014.

Educación en Ciencias Naturales: Situación y Perspectivas. Teórico-práctico (30 horas de duración). Profesor dictante: Dr. Héctor Odetti. Lugar: FACENA-UNNE. Fecha: 2014.

Las TIC's como apoyo a la enseñanza. Teórico-práctico (30 horas de duración). Profesores dictantes: Carina Lion, Patricia Nuñez, Graciela Fernández, Montserrat La Red Martínez. Lugar: Facultad de Medicina-UNNE. Fecha: 2012.

La Evaluación de los Aprendizajes en la Universidad. Teórico-práctico (30 horas de duración). Profesora dictante: Mgter. Martha Espíndola. Lugar: FCA-UNNE. Fecha: 2012.

Enseñar para la comprensión en la Universidad. Teórico-práctico (40 horas de duración). Profesores dictantes: Dra. Paula Alejandra Pogré, Mgter. Javier José Simón, Dra. Cristina Armua. Lugar: FACENA-UNNE. Fecha: 2012.

Las estrategias de enseñanza en la Universidad. Teórico-práctico (30 horas de duración). Profesores: Dra. Liliana Sanjurjo, Mgter. María Alcala, Esp. Patricia Nuñez. Lugar: UNNE. Fecha: 2011.

# Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in *Ilex paraguariensis* grown under field conditions

María Laura Pérez<sup>1</sup> · Mónica Mariana Collavino<sup>1</sup> · Pedro Alfonso Sansberro<sup>1</sup> · Luis Amado Mroginski<sup>1</sup> · Ernestina Galdeano<sup>1</sup>

Received: 17 April 2015 / Accepted: 19 January 2016  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

**Abstract** The composition and diversity of the endophytic community associated with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) was investigated using culture-depending methods. Fungi were identified based on their micromorphological characteristics and internal transcribed spacer rDNA sequence analysis; for bacteria 16S rDNA sequence analysis was used. Fungal and bacterial diversity did not show significant differences between organ age. The highest fungal diversity was registered during fall season and the lowest in winter. Bacterial diversity was higher in stems and increased from summer to winter, in contrast with leaves, which decreased. The most frequently isolated fungus was *Fusarium*, followed by *Colletotrichum*; they were both present in all the sampling seasons and organ types assayed. Actinobacteria represented 57.5 % of all bacterial isolates. The most dominant bacterial taxa were *Curtobacterium* and *Microbacterium*. Other bacteria frequently found were *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Herbiconiux* and *Bacillus*. Nitrogen fixation and phosphate solubilization activity, ACC deaminase production and antagonism against plant fungal pathogens were assayed in endophytic bacterial strains. In the case of fungi, strains of *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* were assayed for antagonism against pathogenic *Fusarium* sp. All microbial isolates assayed showed at least one growth promoting

activity. Strains of *Bacillus*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Brevundimonas* and *Paenibacillus* had at least two growth-promoting activities, and *Bacillus*, *Paenibacillus* and the three endophytic fungi showed high antagonistic activity against *Fusarium* sp. In this work we have made a wide study of the culturable endophytic community within yerba mate plants and found that several microbial isolates could be considered as potential inoculants useful for improving yerba mate production.

**Keywords** Endophytes · Yerba mate · Fungal diversity · Bacterial diversity · PGPB

## Introduction

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a dioecious evergreen subtropical tree; it can reach a height of 30 m although in production fields it remains as a shrub due to regular pruning. After industrial process, yerba mate leaves are used to prepare a tea or infusion named “mate” that is typically consumed in southern South America, including Argentina, Paraguay, Uruguay and Brazil. The particular flavor and stimulating properties of the yerba mate, given by the caffeine and theobromine content (Filip et al. 2001; Schinella et al. 2005), make it preferred to coffee or tea in many cases. This is the only species of genus *Ilex* that is grown for industrial purpose. Argentina is the main yerba mate world producer with 62 % of total production, followed by Brazil with 34 % and Paraguay with 4 %. In Argentina, the crop is grown in the northeastern provinces of Misiones and Corrientes where subtropical climate prevails (Lysiak 2012a, b).

Living plants provide a habitat for microorganisms which can be found both as epiphytes on the plant surface

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11274-016-2016-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ernestina Galdeano  
ernesgaldeano@gmail.com; ernestin@agr.unne.edu.ar

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Instituto de Botánica del Nordeste, UNNE-CONICET, Sargento Cabral 2131, W3402BKG Corrientes, Argentina

and as endophytes within plant tissues. Endophytes can be defined as those organisms that live in association with plants for most if not all their life cycles, and can be distinguished from other plant associated microorganisms based on the recovery from surface-sterilized plant material (Bacon et al. 2002). Endophytic fungi and bacteria have been found in almost all studied herbaceous or woody plant species (Saikkonen et al. 1998; Bacon and Hinton 2006; Porras-Alfaro and Bayman 2011). The scarce cases of plant hosts apparently lacking endophytic communities might respond to culture or technique failure (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006). Endophytes have been found in most plant organs; they can enter the plant through the roots and remain there or become systemic and colonize stem, leaves and even flowers and fruits. However, roots are not the only way of entrance, many phyllosphere endophytes enter the plant through stomata or wounds (McCully 2001; Schulz and Boyle 2006; Danhorn and Fuqua 2007).

Many endophytes have been shown to have plant growth promoting activities, such as nitrogen fixation (Sevilla et al. 2001; Hurek et al. 2002; Iniguez et al. 2004), production of plant growth regulators (Hamayun et al. 2009), plant protection by production of antibiotic (Banger and Thomas 1996), antifungal substances (Hanada et al. 2010) and siderophores (O'Sullivan and O'Gara 1992; Bartholdy et al. 2001), and by systemic resistance induction (Madhaiyan et al. 2004). Although strict endophytes establish non-pathogenic long term association with the plant host, some fungi and bacteria might have a latent or inactive phase, and when the interaction becomes imbalanced either disease results or the pathogen is killed (Schulz and Boyle 2006). Studies have demonstrated that the endophytic community lives in close relation with the plant host influencing physiological processes and interaction with other organisms. Therefore, changes in endophyte composition and diversity might affect plant growth and development. In the case of yerba mate, the identification of bacterial and fungal endophytes will be of great use for developing crop management technologies and improving the species industrial capacity and quality.

There are a few reports of yerba mate associated endophytes. Two endophytic bacteria have been identified, one as in vitro tissue culture contaminant and the other isolated from roots (Collavino et al. 2010; Luna et al. 2013). Endophytic phyllosphere fungi have been described in disinfected leaves from Brazil (Pimentel et al. 2006). There are no reports, however, on the distribution of the endophytic community within the plant nor the variation along the year. The aim of this work was to identify and characterize the culturable endophytic community recovered from surface-disinfected leaves and stems of yerba mate grown under field condition.

## Materials and methods

### Biological material

The diversity of endophytic fungi and bacteria was estimated in young and mature leaves and stems of three yerba mate (*Ilex paraguariensis*) genotypes (SI-49, LM y G-18), from a commercial breeding program (Las Marías Co.) characterized mainly by their ecophysiological features and yield. Mature branches had secondary growth (woody stems), coriaceous and dark leaves while young ones had herbaceous stems and light green leaves. Samples were collected in triplicate in summer 2010, fall 2010, summer 2011, fall 2011 and winter 2011 from an orchard stand of 8000 plants/ha (close canopy structure) localized in Las Marías Co., Gdor. Virasoro, Argentina (28° 02' S, 55° 54' W). The site is characterized by a mean annual rainfall of 1800 mm, distributed mainly during spring and autumn; mean year temperature of 20 °C while frosts are scarce. The soil is described as Ultisol. Three young and mature yerba mate branches (30–60 cm long) were harvested from three random selected plants of each genotype (since no differences were detected among genotypes, samples from the nine plants were analyzed without discriminating genotype) and carried to the laboratory in polyethylene bags at 12–15 °C and immediately processed.

### Endophytic microorganisms isolation

Leaf and stem samples were washed with tap water and disinfected in 20 % bleach solution (1.1 % sodium hypochlorite) for 20 min after 2 min in 70 % ethanol, and rinsed three times with sterile distilled water (Sansberro et al. 2000). Two leaf (2 cm<sup>2</sup>) and stem (1 cm) sections were cut from each branch for bacteria and fungi isolation. Efficiency of surface sterilization was assayed by inoculating 100 µl of the last rinse water on bacterial and fungal culture medium, and negative samples were selected for further microorganisms isolation.

Fungi were isolated on potato glucose agar medium (PGA, Britania, Argentina) supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup> streptomycin. In the case of bacteria, plant sections were macerated in sterile microtubes and 70 µl of a 1:10 dilution were plated on Petri dishes with tryptone soybean agar medium (TSA) supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup> cycloheximide. Samples were incubated at 27 °C, until fungal and bacterial growth was noticeable (7–30 and 5–10 days, respectively). When fungal and bacterial growth appeared, the colonies were counted and grouped by their cultural characteristics, and representative isolates were collected, purified and preserved for future analysis. The endophytic

microorganisms obtained in this study have been stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  at the Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE).

## Identification of endophytic microorganisms

### Fungi

Isolated fungi were identified based on their micromorphological characteristics on PGA medium, mainly according to Domsch et al. (1980) and Ellis (1971, 1976). Isolates that did not sporulate on PGA medium were cultured on different semi-selective media in order to induce typical growth and fungal sporulation. Fusarium-like isolates were transferred to SNA medium (Spezieller Nährstoffarmer Agar) with filter paper (Leslie and Summerell 2006). Other isolates were transferred to cornmeal agar with sterile soybean stems (Dhingra and Sinclair 1985). Incubation conditions were 12 h light with near ultra violet or black lamps (360 nm highest emission). One representative strain for each morphotype was selected for molecular identification using internal transcribe spacer (ITS) ITS1-5,8S-ITS2 rRNA region sequence analysis.

DNA was directly extracted from fungal mycelium grown in liquid potato glucose medium in a 1.5 tube for 72 h at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  according to Cenis (1992). After centrifugation, the mycelial mat was washed in TE (Tris EDTA) buffer and DNA extracted with 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer by crushing with a conical grinder. DNA was precipitated by centrifugation with isopropanol, washed with 70 % ethanol and resuspended in 50  $\mu\text{l}$  of TE. DNA quality and concentration were assessed using a NanoDrop<sup>®</sup> spectrophotometer. Extractions yielded between 50 and 100  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  DNA with 1.6–1.8 260/280 ratio. Approximately 20 ng DNA were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification of ITS1-5,8S-ITS2 region with primers ITS1 (5'-TCCGATGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). The reaction conditions were as follows:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min followed by 30 cycles of denaturation at  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 min, annealing at  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 min and primer extension at  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 min; followed by a final extension at  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The amplification products were separated by agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and observed under UV light. For identification, the PCR fragments were purified using a AccuPrep Gel Purification kit (Bioneer), and DNA sequencing was performed by Sanger method using ITS4 primer at the Instituto de Biotecnología (Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, CICVyA-INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina). Partial ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene sequences retrieved in this study were deposited in the Gene-

Bank database under accession numbers KP195143-89 and KP990803.

### Bacteria

The 16S rDNA gene was amplified by PCR from genomic DNA isolated from pure bacterial colonies. For DNA extraction, Chelex 100 chelating resin (Bio-Rad) was used according to Alippi and Aguilar (1998). A pellet was obtained after centrifugation of 200- $\mu\text{l}$  suspension of single colonies in sterile distilled water. The pellet was resuspended in 150  $\mu\text{l}$  of an aqueous suspension of 6 % resin Chelex 100 (Bio-Rad), incubated at  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min, vortex mixed, incubated at  $99\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 8 min and vortex mixed again. Bacterial debris and resin were precipitated by centrifugation and 2  $\mu\text{l}$  of the supernatant were used for the PCR reactions. The 16S rDNA was amplified with universal primers rD1 (3'-AAGGAGGTGATCCAGCC-5') and fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Weisburg et al. 1991). The reactions were performed under the following conditions:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min, 30 cycles of  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 min, followed by one cycle of  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Amplified PCR products were visualized by 1 % agarose gel electrophoresis. For identification, the PCR products were purified using Pure-Link<sup>™</sup> Quick Gel Extraction & PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) and sequenced by Sanger method using rD1 primer at Macrogen Inc., Korea. Partial 16S rDNA gene sequences retrieved in this study were deposited in the GeneBank database under accession numbers KP195190-258.

### Phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were compared with NCBI GenBank entries and similarities were determined using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sequence similarity was calculated after Clustal W multiple sequence alignment using MegAlign program (DNASTAR, Laser-gene). Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 6 (Tamura et al. 2013). Consensus cladograms were generated based on the maximum likelihood method, with the reliability provided by 1000 replications bootstrap test.

### Diversity analysis

Shannon ( $H'$ ) (Bowman et al. 1971) diversity index was calculated using the Past 3.01 software package. Diversity indexes were compared by non-parametric Kruskal–Wallis H test considering organ type, age and season, using Infostat v. 2014 (Di Rienzo et al. 2014).



## In vitro screening for plant growth promoting activities

In vitro growth promoting activities including nitrogen fixation, phosphate solubilization, ACC deaminase gene detection and antagonism against plant fungal pathogens were assayed in 22 bacterial strains representative of genera *Pantoea*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Herbiconiux*, *Sphingomonas*, *Roseomonas*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Xylophilus*, *Paenibacillus* and *Mycobacterium*. They were also tested for hypersensitive reaction (HR) on tobacco, which allows detection of some pathogenic traits. In the case of fungi, *Fusarium* isolates were assayed for pathogenicity, and strains of *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* were also assayed for antagonism against pathogenic *Fusarium* sp.

### Nitrogen fixation

Bacteria were tested in their free-living nitrogen fixation ability by growing them on semi-solid nitrogen free NFB medium (Döbereiner et al. 1995) along three successive subcultures at 28 °C.

### Phosphate solubilization test

Bacteria were grown on National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) with 5 g l<sup>-1</sup> of tricalcium phosphate (TCP) as the exclusive P source (Nautiyal 1999) and incubated at 28 °C for 2 weeks. Every 2 days halo size and colony diameter were measured, and the solubilization index (SI) was calculated by subtracting the colony diameter from the halo total diameter. Strains displaying an SI equal to or higher than 1.4 in three replicates were considered efficient P solubilizing bacteria. *Pseudomonas* RHP3 strain was used as positive control (Mehta and Nautiyal 2001).

### Detection of ACC deaminase gene

Isolates were tested for the presence of *acdS* gene, required for the production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, by specific PCR amplifications from genomic DNA. The PCR-detection of *acdS* was performed using the primers F1936f and F1938r (792 bp) as recommended by Blaha et al. (2006). *Pseudomonas putida* ATCC 17399/pRK-ACC (Grichko and Glick 2001) was used as positive control for *acdS* amplification.

### Antagonism assay against *Fusarium* sp

Bacterial and fungal isolates were tested for antagonism against *Fusarium* sp. by the dual culture technique

(Fokkema 1978). The pathogenic *Fusarium* strain had been previously isolated from yerba mate symptomatic stems. A mycelial plug from *Fusarium* sp actively growing on potato glucose agar (PGA- Britania) was taken with a 0.5 cm diameter cork borer and placed off center (1.5 cm from the border) on PGA medium in a 9 cm Petri dish. The potential antagonists were inoculated 5 cm from the *Fusarium* plug equidistant from the opposite border. Bacteria were grown in TSB (Tryptone Soybean Broth) from which 10 µl of a 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> suspension was inoculated; fungal isolates were inoculated in the same way as the pathogenic *Fusarium*. Control plates contained only a 0.5 cm diameter *Fusarium* sp. plug in the same position as in the dual culture plates. Dual cultures were incubated at 28 °C during 14 days. *Fusarium* sp. colony growth was registered 7 and 14 days after inoculation and Growth Inhibition (GI) was calculated according to Fokkema (1978):  $GI = kr - r1/kr \cdot 100$  ( $kr$  = mean of *Fusarium* growth on control plates from the inoculation point towards the plate center in mm;  $r1$  = *Fusarium* growth on dual-culture plate from the inoculation point towards the plate center in mm).

### Hypersensitive response (HR) on tobacco

Bacterial isolates were inoculated into tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves to evaluate their ability to induce HR (Klement 1963). The isolates were incubated individually at 28 °C for 24 h in TSA medium. Bacteria suspension was prepared in sterile water, and the concentration of bacterial cells was adjusted using a spectrophotometer to approximately 10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup> before inoculation into fully expanded tobacco leaves using a hypodermic syringe. The needle was inserted into interveinal regions, and the bacterial suspension was injected into the mesophyll intercellular spaces. A negative control containing only sterile water was included in each leaf. Tobacco plants were maintained in a climatic room with a temperature of 26 °C ± 1 with 15 h photoperiod provided by high-pressure sodium lamps (Vialox®, 400 W, OSRAM GmbH, Germany). A positive HR reaction was recorded when the inoculated leaf tissue collapsed or light brown necrosis occurred within 48 h after inoculation. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* was used as a positive control. Each inoculation was repeated at least three times.

### Pathogenicity test of *Fusarium* isolates

Three *Fusarium* isolates related to *F. oxysporum*, *F. lateriticum* and *F. fujikuroi* species were tested for pathogenicity on *Ilex paraguariensis* under greenhouse conditions using 5–6 leaf seedlings grown in pine wood

chips substrate and in vitro conditions using plantlets obtained from embryo culture.

Three inoculation techniques were assayed for seedlings: (1) Inoculation of 1 ml conidial suspension on wounded stems, (2) wounded root soak (over night) inoculation with conidial suspension, and (3) agar plug inoculation (approximately 10 mm of fungal colony) on wounded stems and roots. In vitro plantlets were inoculated with 50  $\mu$ l of conidial suspension by stem wounding using a sterile syringe. The experimental design consisted of five plants (greenhouse assays) or ten plants (in vitro assays) per treatment, included the mock-inoculated control, with three replicates each. Inoculum consisted of  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  suspension according to Zum Felde et al. (2006). The selected *Fusarium* isolates were grown on PGA plates until they produced sufficient conidia. Under laminar-flow hood, conidia were removed from plates by pouring sterile distilled water onto the agar surface with a flame-sterilized glass scraper. Conidial suspension was filtered through sterile gauze into a sterile glass flask. Concentration was determined using a Neubauer haemocytometer and adjusted to  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  with sterile water. Control plantlets were inoculated with sterile water or agar. In vitro plants were incubated at  $27 \pm 2$  °C in a controlled environment room. Greenhouse conditions consisted in 25–30 °C average temperature and 80 % soil humidity achieved by regular watering. Symptom severity was weekly assayed using a subjective rating scale adapted from La Mondia and Taylor (1987) in which 0 = healthy plant, 1 = stunted or off-color plant, 2 = plants with one symptomatic leaf, 3 = plants with more than one symptomatic leaf, 4 = dead plants. *Fusarium* spp. were re-isolated on PGA medium from inoculated plants.

## Results

### Fungal and bacterial diversity

A total of 216 leaf and stem samples were collected during six surveys performed in summer and fall 2010, and summer, fall and winter 2011. From which 156 (66 from stems, 94 from leaves) and 193 (126 from stems, 66 from leaves) different fungal and bacterial isolates were obtained, respectively. Fungal and bacterial diversity did not show significant differences between organ age. The highest fungal diversity was registered during fall season and the lowest in winter in both leaf and stem samples, with significant difference between leaves and stems in the fall samples (Fig. 1a). Bacterial diversity was higher in stems and increased from summer to winter (summer < fall < winter), in contrast with leaves, which

decreased (summer > fall > winter), showing significant difference in the winter samples (Fig. 1b).

### Endophytic fungus composition

Based on morphological and sequence analysis, the endophytic filamentous fungi isolated from yerba mate belonged to the Ascomycetes group, distributed in nine Orders: Trichosphaeriales, Hypocreales, Diaporthales, Eurotiales, Capnodiales, Glomerellales, Pleosporales, Botryosphaeriales and Xylariales.

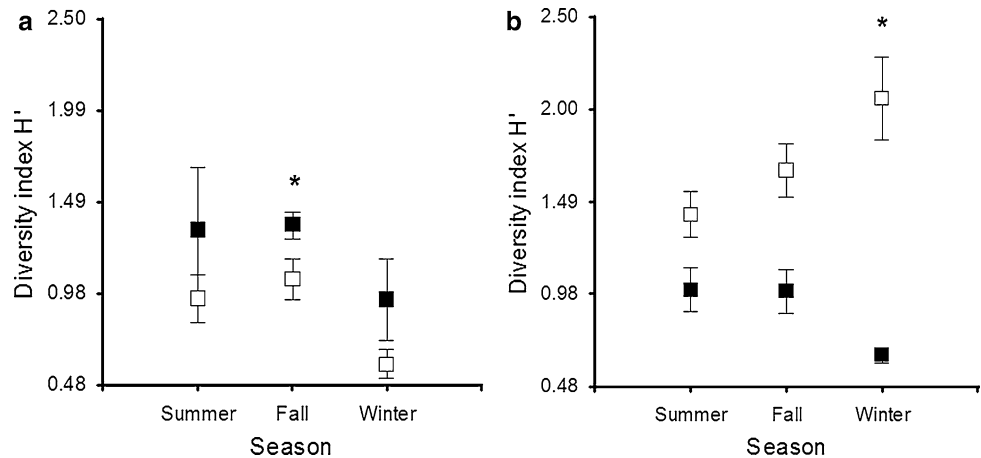
Exploratory BLAST analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rRNA partial sequences (260 bp) retrieved similarity to 13 genera including *Acrocalymma*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Clonostachys* (*Bionectria*), *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium* (*Nectria*), *Guignardia* (*Phyllosticta*), *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Phomopsis* (*Diaporthe*).

Order Hypocreales represents 57.7 % of the fungal isolates. Most of them (85.5 %) corresponded to *Fusarium* species, which presented typical chlamydospores, microconidia and fusiform- to sickle-shaped macroconidia. According to the phylogenetic tree based on rDNA sequences (Fig. 2), *Fusarium* isolates were grouped into five different clusters, six closely related isolates clustered with *F. fujikuroi*, one isolate was related to *F. proliferatum*, one to *F. oxysporum*, three to *F. solani* and three clustered with *F. lateritium* and *F. xylarioide*. *Fusarium* was the most frequently isolated fungal genus. It was present in all sampling seasons and organ type. Two isolates obtained in fall and winter 2011 from young stems were identified as *Trichoderma* based on morphological characteristics, but could not be represented in the phylogenetic tree due to sequences low quality.

Order Glomerellales was represented by *Colletotrichum* with 14 isolates that produced long conidiophores with hyaline single-celled ovoid conidia when grown on PGA medium. Phylogenetic analysis showed that one isolate is closely related to *C. incarnatum* while the rest formed a cluster with *C. boninense* and *C. gloeosporioides* (Fig. 2). They were found on either young or mature leaves and stems in all sampling dates.

Order Diaporthales. Isolates in this order also corresponded to one genus, *Phomopsis*/*Diaporthe*. They represented 6.4 % of all fungal isolates, and were obtained from leaf and stem samples in summer and fall 2010. In all cases, asexual morphs could be observed in the colonies growing on PGA. Structures were mainly dark pycnidia with hyaline single-celled conidia; in some cases fusiform ( $\alpha$ ) and curved ( $\beta$ ) conidia could be observed. The isolates were separated in four groups according to the phylogenetic tree, which clustered with sequences from

**Fig. 1** Diversity of endophytic fungi (a) and bacteria (b) isolated from yerba mate leaves (black squares) and stems (white squares). Shannon index ( $H'$ ) was compared considering organ type and season using non-parametric Kruskal–Wallis H test. \* indicates significant difference ( $p = 0.05$ ) between leaf and stem samples in one season. Bars indicate standard error



*D. phaseolorum* and *P. euphorbiae*, *D. paranensis*, *P. longanae*, and *D. heveae* (Fig. 2).

Order Eurotiales. The second most represented order was Eurotiales with 20 isolates (12.8 %), 16 of which were identified as genus *Penicillium*, 3 as *Aspergillus*, and only one isolate corresponded to *Paecilomyces*. *Penicillium* isolates, found in all types of samples from summer 2010/2011 and fall 2011, were related to species *P. citrinum*, *P. citreonigrum* or *P. oxalicum*. *Aspergillus*, on the other hand, was isolated only from young or mature stems in fall 2011.

Order Capnodiales was represented by seven close related isolates (4.5 %), which clustered in the phylogenetic tree with *Cercospora capsicigena*, *C. kikuchii* and *C. canescens* species. They were obtained from fall and summer 2011, young and mature leaf and young stem samples. The same amount of isolates corresponded to order Botriosphaerales, among them were identified genera *Neofusicoccum* (*N. kwambonambiense* and *N. brasiliense*) and *Phyllosticta/Guignardia* (*P. elongata* and *G. mangiferae*).

Less represented orders were Pleosporales with two isolates related to *Curvularia* (*C. lunata*, *C. australiensis* and *C. crepinii*), which were found only in summer 2010 on young leaf samples, and *Microsphaeropsis arundinis*, obtained from fall 2011 samples, and order Xylariales with only one *Eutypa* isolate.

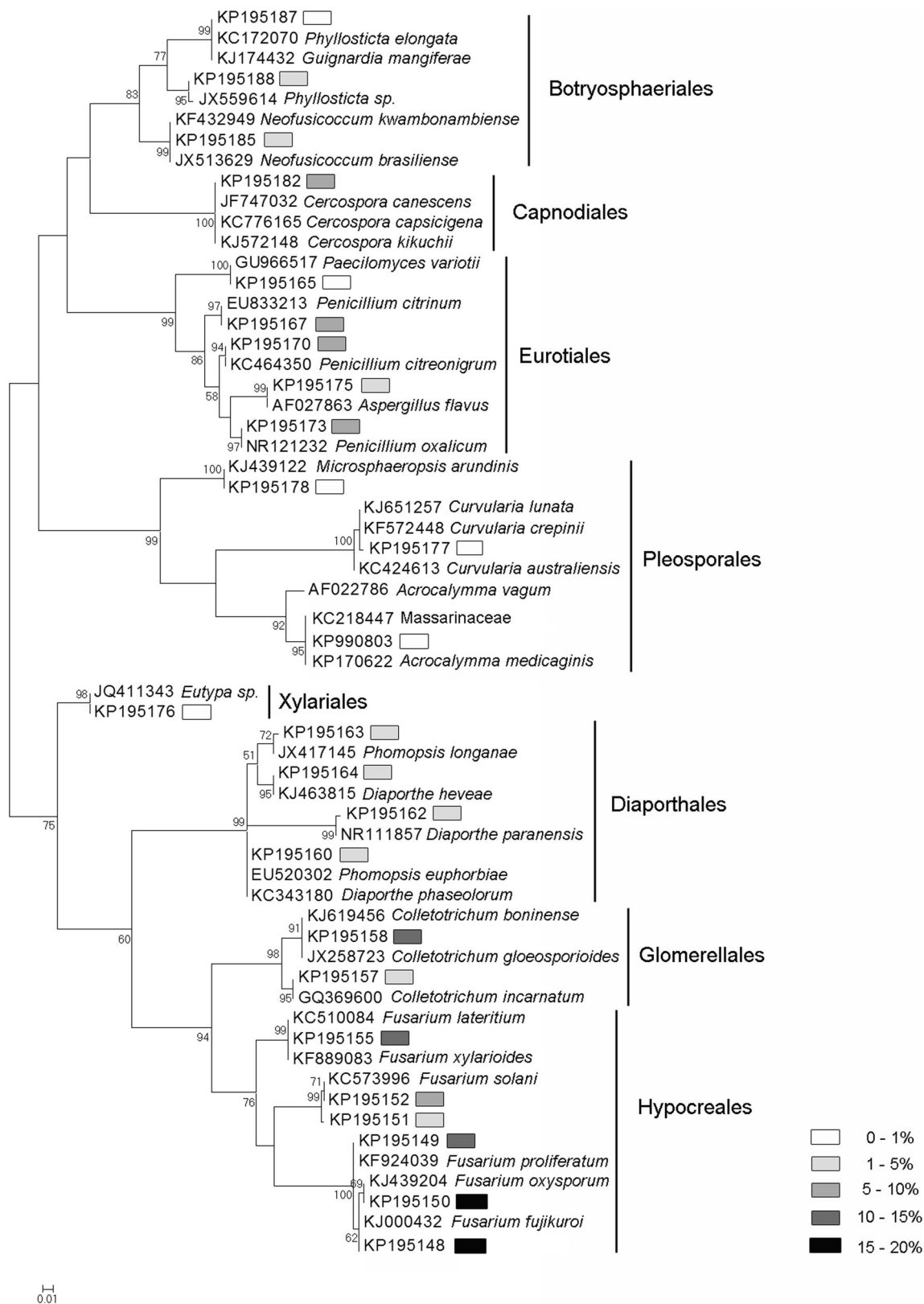
### Endophytic bacterial composition

A total of 193 bacterial isolates were identified at least at the genus level by 16S rDNA sequence analysis. Sequences of the bacteria isolated from yerba mate were preliminary compared with the Genbank database by BlastN analysis. After that, sequences were aligned and phylogenetic trees generated by maximum likelihood in which representative bacteria sequences were included.

Actinobacteria represented 57.5 % of all bacterial isolates. The remaining isolates were related to Firmicutes (26.9 %), Alphaproteobacteria (11.9 %) and Gammaproteobacteria (3.6 %). The most numerous genera within Actinobacteria were *Curtobacterium* and *Microbacterium*. *Curtobacterium* was the most numerous genus with 46 isolates obtained from all types of organ during all sampled seasons. In the phylogenetic tree (Fig. 3), the isolates were related with *Curtobacterium flaccumfaciens*, *C. pusillum* and *C. albidum*. The other group of numerous isolates (42) obtained from all sample types was associated with *Microbacterium*. The isolates were grouped into five clusters related to *Microbacterium paludicola*, *M. trichotecenolyticum*, *M. pumilum* and *M. arborescens*, *M. maritipicum* and *M. oxydans*, and *M. testaceum*.

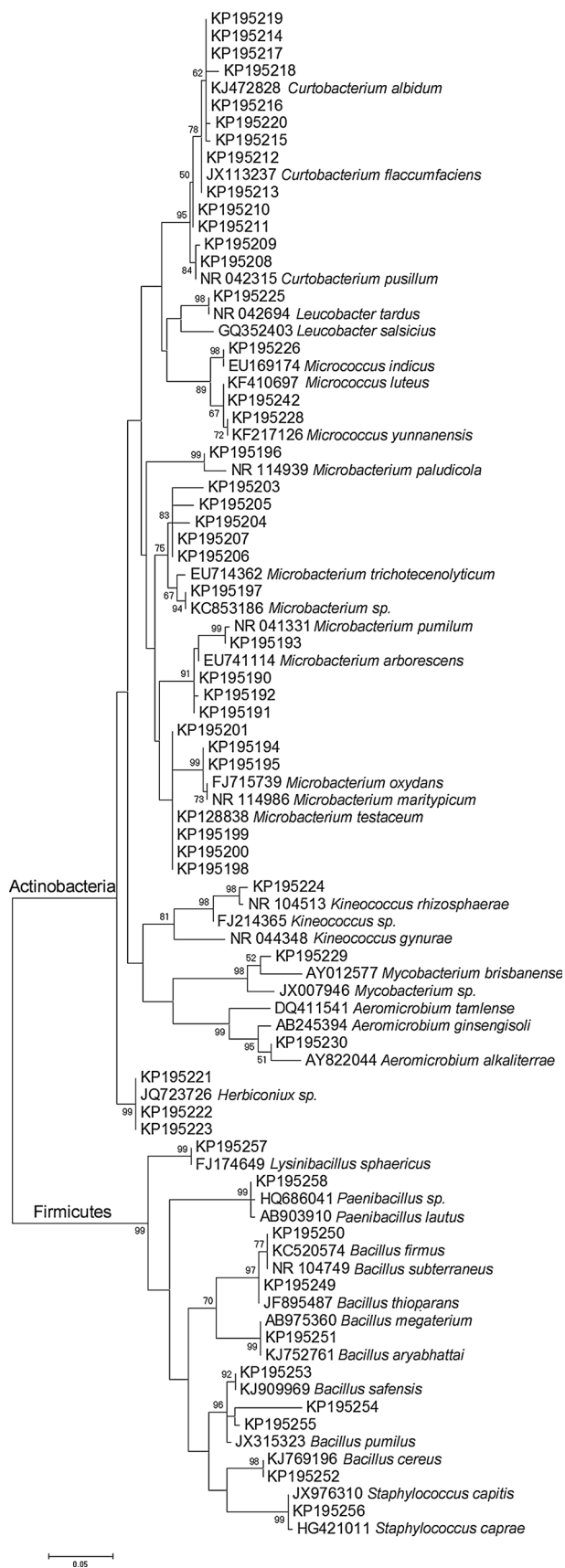
Other isolates (27) associated with class Actinobacteria corresponded to genera *Herbiconiux*, *Kineococcus*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* and *Aeromicrobium* (Fig. 3). The strains related to *Herbiconiux* sp. were isolated in all sampling dates from all organ types except for young leaves. Only one strain was obtained for each of genus *Kineococcus*, *Leucobacter*, *Mycobacterium* and *Aeromicrobium*. One strain related to *Kineococcus rhizosphaerae* was isolated from mature stems, and one related to *Leucobacter tardus* was found on mature leaves; both of them were present only during the fall seasons. Another strain, related to *Aeromicrobium alkaliterrae*, was found only in older stems during the winter season. *Mycobacterium*, on the other hand, was obtained from all types of organs in summer 2010. Three strains were related to different species of *Micrococcus*, *M. indicus*, *M. luteus*, and *M. yunnanensis*. All of them were found only during the fall season.

Firmicutes was represented by nine strains related with *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* and *Paenibacillus* species (Fig. 3). Seven strains were related to *Bacillus* species. Among them, one strain each clustered with



**Fig. 2** Phylogenetic tree constructed by maximum likelihood phylogenetic inference based on s ITS1-5.8S-ITS2 region partial sequences including endophytic fungi isolated from yerba mate

(*I. paraguariensis*) and closest related genus or species representative. Bootstrap values are shown on branches (1000 replications)



◀**Fig. 3** Actinobacteria and Firmicutes phylogenetic tree constructed by maximum likelihood phylogenetic inference based on 16S rRNA partial sequences including endophytic bacteria isolated from yerba mate (*I. paraguariensis*) and closest related representative species or genus. Bootstrap values are shown on branches (1000 replications)

*B. thioparans*, *B. subterraneus* and *B. firmus*, *B. aryabhattai* and *B. megaterium*, *B. cereus*, and three strains clustered with *B. pumilus* and *B. safensis*. Genera *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* and *Paenibacillus* were represented by a single strain each, associated with *Staphylococcus caprae* and *S. capitis*, *Lysinibacillus sphaericus*, and *Paenibacillus lautus*.

Alphaproteobacteria was represented by 16 strains, associated with *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Phenylobacterium*, *Brevundimonas* and *Roseomonas* species (Fig. 4). *Methylobacterium* was represented by five strains obtained from all organ types and sampling seasons. They were associated with *M. brachiatum*, *M. aquaticum*, *M. jeotgali*, and *M. phyllosphaerae*. *Sphingomonas* strains were also present in all seasons and organ type. Three strains could be related to *Sphingomonas* sp. The order Rhizobiales was represented by two strains related to *Roseomonas* sp., found only during the fall season in old leaves and young stems, and four *Rhizobium* sp. strains that were obtained in all seasons only from young organs. Caulobacterales was represented by *Phenylobacterium haematophilum*, *Brevundimonas diminuta*, *B. nasdae* and *B. subvibrioides*. Only two strains were associated with class Gammaproteobacteria (*Xylophilus* sp. and *Pantoea* sp.).

**In vitro screening for plant growth promoting (PGP) activities**

*Nitrogen fixation*

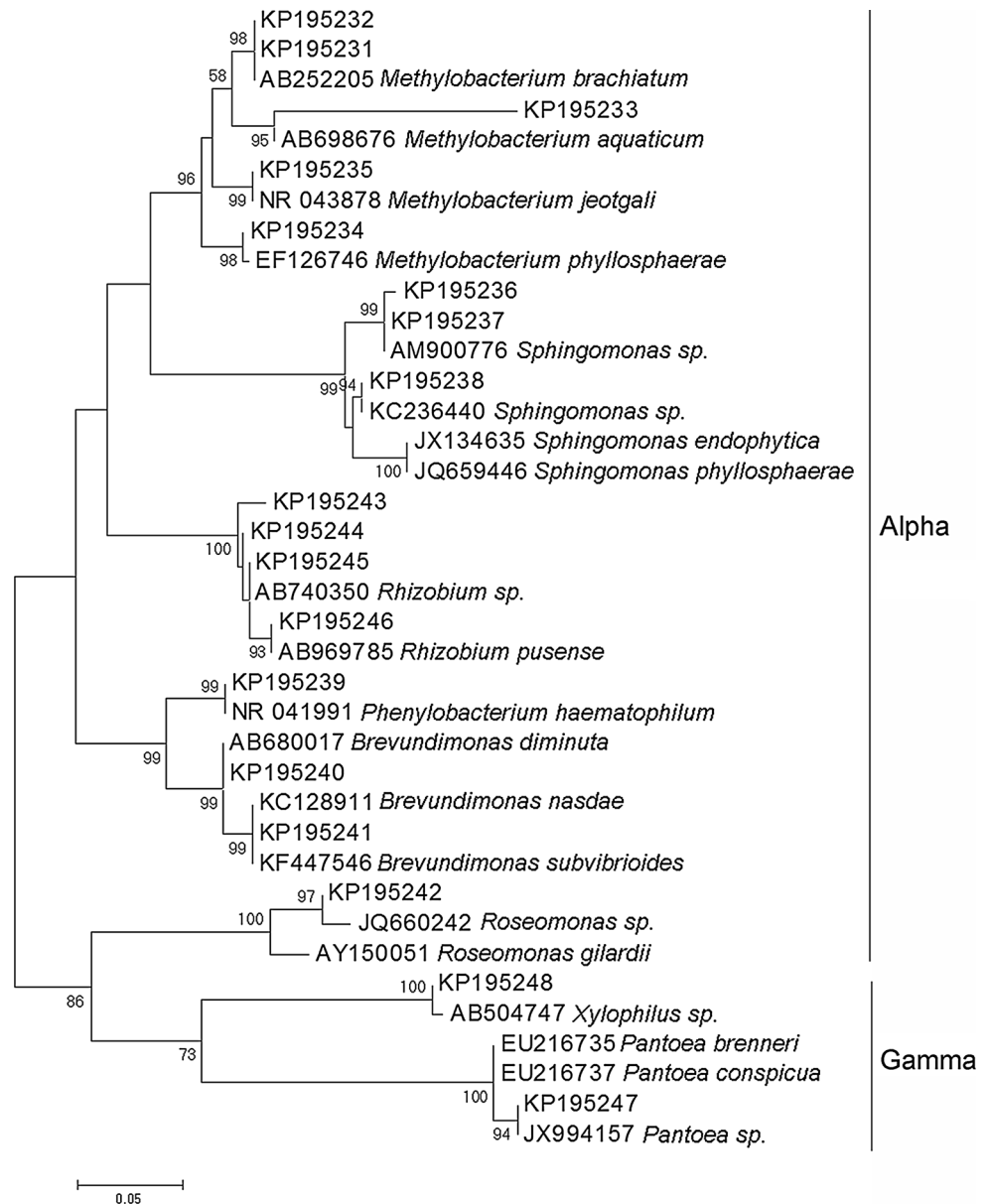
Isolates of genus *Micrococcus*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium*, *Paenibacillus*, *Brevundimonas*, *Roseomonas* and *Mycobacterium* were able to grow on nitrogen free medium, indicating free-living nitrogen fixation capability (Table 1).

*Phosphate solubilization test*

Seventeen bacterial isolates were able to grow on NBRIP medium with TCP as only P source, indicating P solubilization capability (Table 1). Seven of them were efficient solubilizers (SI higher than 1.4). Among them, *Pantoea* and *Bacillus* isolates were considered early solubilizers since they had significant solubilizing activity during the first hours of culture, with maximal activity within the first



**Fig. 4** Proteobacteria phylogenetic tree constructed by maximum likelihood phylogenetic inference based on 16S rRNA partial sequences including endophytic bacteria isolated from yerba mate (*I. paraguariensis*) and closest related representative species or genus. Bootstrap values are shown on branches (1000 replications)



72 h of growth. *Curtobacterium*, *Methylobacterium* and *Brevundimonas* isolates, on the other hand, were late solubilizers, showing low activity during the first 72 h and reaching maximal activity between the fourth and fifth days.

#### Detection of ACC deaminase gene

All the endophytic bacteria assayed resulted negative for the PCR detection of *acdS* gene while the reference strain produced the expected 792 bp band (Table 1). Bacterial DNA proved to be amplifiable by PCR-analysis for 16S rRNA gene using universal primers rD1-fD1 (Weisburg et al. 1991).

#### Antagonism assay against *Fusarium* sp

All the isolates assayed showed some level of growth inhibition of the *Fusarium* sp colony when co-cultured, except for *Curtobacterium* ga and both *Methylobacterium* isolates which inhibited less than 5 % (Table 1). The most efficient antagonists strains were *Bacillus* 1N (100 % GI, 7 days after inoculation) and *Paenibacillus* 1o (58 % GI), followed by *Rhizobium* M1e, *Bacillus* 18 and 12b, and *Pantoea* ao2 (GI between 25 and 50 %). The other isolates showed GIs between 1 and 25 %. The three fungal isolates of *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Penicillium* inhibited up to 65–75 % of *Fusarium* mycelium growth 7 days after

**Table 1** Growth promoting activities of selected yerba mate microbial isolates

Isolate name (Accession number)	Organ source <sup>a</sup>	Fungal growth inhibition (%) <sup>b</sup>	Phosphate solubilization activity (SI) <sup>d</sup>	Free-living nitrogen fixation <sup>e</sup>
<i>Bacillus</i> 2K (KP195254)	S	23.6	1.25	+
<i>Bacillus</i> 1N (KP195255)	S	100	2	+
<i>Bacillus</i> 12b (KP195253)	L	49	2	+
<i>Bacillus</i> 3a (KP195249)	L	16.4	0	+
<i>Bacillus</i> 18 (KP195252)	S	29	0	–
<i>Bacillus</i> Bc3 (KP195251)	L	16.3	1	+
<i>Brevundimonas</i> 2t (KP195241)	S	9.1	3	+
<i>Curtobacterium</i> ga (KP195219)	S	9	2	+
<i>Curtobacterium</i> 2A (KP195220)	S	0	2	+
<i>Herbiconiux</i> 8da (KP195221)	S, L	23.6	1	+
<i>Methylobacterium</i> R1 (KP195232)	S	3.6	1	+
<i>Methylobacterium</i> Rc3 (KP195231)	S, L	3	1.75	+
<i>Micrococcus</i> Bc7 (KP195226)	S	16.4	1	–
<i>Micrococcus</i> af3 (KP195228)	L	5	1	+
<i>Mycobacterium</i> 7 (KP195229)	S, L	16.3	1	+
<i>Paenibacillus</i> 1o (KP195258)	L	58.2	0	+
<i>Pantoea</i> ao2 (KP195247)	L	25.4	2.6	–
<i>Rhizobium</i> 10h (KP195245)	L	14.5	1	–
<i>Rhizobium</i> M1e (KP195243)	S	43.6	1	–
<i>Roseomonas</i> 19q (KP195242)	S	16.4	1	+
<i>Sphingomonas</i> 27 (KP195236)	L	20	0	–
<i>Xylophilus</i> 15L (KP195248)	L	18.2	0	+
<i>Trichoderma</i> (KU323643)	S	66.7 <sup>c</sup>	nd <sup>f</sup>	nd
<i>Aspergillus</i> (KP195175)	S	70.4 <sup>c</sup>	nd	nd
<i>Penicillium</i> (KP195172)	L, S	74.1 <sup>c</sup>	nd	nd

<sup>a</sup> L leaf, S stem

<sup>b</sup> Growth inhibition (GI) 14 days after culture against *Fusarium* sp. in dual cultures

<sup>c</sup> For fungal isolates, values represent GI 7 days after culture since antagonists grew over the *Fusarium* colony

<sup>d</sup> Maximal P solubilization activity in NBRIP medium supplemented with tricalcium phosphate. SI of reference strain *Pseudomonas* RHP3: 2.2

<sup>e</sup> Growth on semi-solid nitrogen free NFb medium. +: positive, -: negative

<sup>f</sup> nd not assayed

inoculation, and continued growing over the *Fusarium* colony.

### Pathogenicity test of *Fusarium* isolates

The three *Fusarium* strains were negative for pathogenicity when tested on greenhouse growing yerba mate seedlings. Different results were obtained when in vitro growing plantlets were inoculated. In such conditions the tree isolates were able to produce disease symptoms, including leaf yellowing, leaf and roots dead, and whole plant dead (Online resource 1). All inoculated isolates reached severity levels of at least three according to the scale

(plants with more than one symptomatic leaf) after 49 days, with 50–60 % plantlets dead. Internal and external mycelial growth was observed in symptomatic plantlets, and in all cases the fungus was re-isolated and identification coincident with the inoculated strain.

### Discussion

In this work we identified fungal and bacterial endophytes that inhabit yerba mate (*Ilex paraguariensis*), and analyzed the distribution within aerial organs and seasonal variation, considering endophytes as the culturable community

recovered from surface-disinfected plant material. In a previous work, Pimentel et al. (2006) had reported the endophytic fungal population in cultivated and native yerba mate leaves in Brazil. In leaf samples from cultivated plants they recognized five fungal genera (*Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Trichoderma*). In the present work we identified the same fungi and nine other not reported previously (*Acrocalymma*, *Cercospora*, *Clonostachys*, *Curvularia*, *Guignardia*, *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Paecilomyces* and *Phomopsis*). Besides, endophytic isolates of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* identified in this work showed antagonistic activity against *Fusarium*, a typical soil pathogen that affects yerba mate nurseries, and represent possible biological controllers for this species.

We also identified 20 taxa of endophytic bacteria isolated from yerba mate leaves and stems. Recently, two endophytic bacteria have been reported in yerba mate, *Enterobacter* sp. (Collavino et al. 2010) and *Stenotrophomonas malthophilia* (Luna et al. 2013). We did not find such bacteria in our surveys, which might respond to different organ source and plant growth conditions since *Enterobacter* sp. has been isolated from roots and *S. malthophilia* from stems of greenhouse growing plants. On the other hand, we have isolated *Pantoea* sp., which has been previously reported associated with yerba mate rhizosphere (Collavino et al. 2010). The differences registered in bacterial composition and ecological niche suggest that, except for *Pantoea* sp., endophyte establishment in yerba mate aerial organs might have happened independently from root colonization. Further investigation would be necessary to find out the source and colonization means of the yerba mate aerial endophytic bacteria.

Seasonal variation of endophytic communities has been reported in several plant species showing the influence of factors such as environmental temperature and humidity as well as host plant growth dynamics (Osono 2008; Jumpsonen and Jones 2010). Ding et al. (2013) proposed that plant leaf-associated bacterial communities vary in response to inner biochemical environment changes of the host plants as well as weather and overall environment variations. As reported in other woody species (Kim et al. 2013; Scholtysik et al. 2013), our results showed that fungal diversity begins to increase in the summer reaching the highest values during the fall season. Considering that yerba mate is grown in a climate with rainy fall and spring seasons, the increasing humidity might be one of the factors that favor endophytic fungal growth. Yerba mate bacterial endophytic community varied depending on the organ source. The highest stem bacterial diversity was registered in winter as well as the lowest diversity of leaf samples. These results might be related to low diversity of bacteria in the phyllosphere due to lack of nutrients, UV radiation

and desiccation (Lindow and Brandl 2003). Variation of bacterial composition as affected by plant tissue has been reported in several plant hosts (Ma et al. 2013; Jin et al. 2014).

Several studies have revealed age-dependent variations of endophytic communities. Species richness of *Camellia japonica* endophytic fungi was low at leaf emergence and increased as leaves aged (Osono 2008), and similar results were found in *Pinus* needles (Guo et al. 2008). Based on such results, many authors supported the early hypothesis of predominantly horizontal transmission of endophytes in trees, as old plant tissues would have had more time to accumulate endophytes from the environment, as opposed to outgrowth from a few initial infection sites (Carroll and Carroll 1978; Guo et al. 2008). In yerba mate, no significant differences were found between young and older leaves and stems although the highest number of fungal and bacterial isolates came from mature leaves and stems, respectively. The crop management practices used in yerba mate fields might explain the low variation of the endophytic community. Yerba mate leaves are harvested three times a year, in June, July–August, and September in such way that the oldest branches and leaves are no more than 1 year old.

Most of the endophytic fungal genera that were isolated and identified in yerba mate have been reported previously as endophytes of woody plants in several geographical regions (Fisher et al. 1993; Suryanarayanan and Vijaykrishna 2001; Sette et al. 2006; Hanada et al. 2010). The most frequently isolated fungus was *Fusarium*; it was present in all the sampling seasons and organ types assayed. Three isolates related to *F. oxysporum*, *F. lateriticum* and *F. fujikuroi* species were tested for pathogenicity on yerba mate plants growing in greenhouse and in vitro conditions. We could not see any disease symptoms on the yerba mate plants from which the samples had been taken; moreover, pathogenicity test performed on pot growing plants was negative. However, when sterile in vitro growing plants were inoculated all three isolates resulted pathogenic and produced symptoms. *Fusarium* species are highly common endophytes, reported in almost all studied host plants. It has even been suggested that endophytism is part of the life cycle of many plant-associated *Fusarium* species (Kuldau and Yates 2000). In support of this hypothesis, endophytic *Fusarium* isolates have been found to be plant pathogens (Kuldau and Yates 2000; Rubini et al. 2005), latent pathogens (Schulz and Boyle 2006; Kharwar et al. 2010), or beneficial with biological control activity (Shiono et al. 2007; Deng et al. 2009). *Colletotrichum* was another frequently found fungal genus. Among others, it has been isolated from *Coffea arabica* and *C. robusta* (Sette et al. 2006), *Ficus benghalensis* (Suryanarayanan and Vijaykrishna 2001), *Camellia japonica* (Osono 2008) and



*Theobroma cacao* (Hanada et al. 2010). Our results agree with *Colletotrichum* being a typical ubiquitous endophyte since we isolated it from young and old leaves and stems during all sampling seasons.

Among the bacteria isolated from yerba mate, Actinobacteria was the most abundant taxon, in particular the genera *Curtobacterium* and *Microbacterium*, which were isolated from all the organs assayed, showing that they are ubiquitous endophytes. Similar results have been reported in several plant hosts (Zinniel et al. 2002; Thomas et al. 2006; Magnani et al. 2010; Gagne-Bourgue et al. 2013). Plant endosphere is a common actinobacteria habitat, in which the bacteria show different degree of functional and genetic diversity. They play an important role for the host plant by producing high amounts of catabolites and growth promoting compounds (Araujo et al. 2002; Lacava et al. 2007; El-Shatoury et al. 2013; Brader et al. 2014). At least two of the endophytic *Curtobacterium* isolated from yerba mate had the ability to efficiently solubilize phosphates and fixing nitrogen, one of them had also the ability of inhibiting *Fusarium* growth.

Other bacteria frequently found throughout the year were the alphaproteobacteria *Methylobacterium*, and *Sphingomonas*. These genera have been isolated as endophytes elsewhere and proved to have growth promoting activities. Species of genus *Methylobacterium* have been reported to interact as endophytes with several plant species such as *Citrus* spp. (Araujo et al. 2002), *Eucalyptus* sp. (Ferreira et al. 2008) *Coffea arabica* and *Capsicum annum* (Dourado et al. 2012). Among them, *Methylobacterium nodulans* is involved with nitrogen fixation, as well as some *Sphingomonas* species (Sy et al. 2001; Videira et al. 2009). We detected similar activity in *Methylobacterium* isolated from yerba mate but not in *Sphingomonas*. As regards biological control, isolates from *Sphingomonas* were able to inhibit *Fusarium* growth. However, the endophytic bacteria that most efficiently controlled *Fusarium* in dual cultures were the Firmicutes *Bacillus* and *Paenibacillus*, which were also able to fixing nitrogen and, in the case of *Bacillus*, phosphate solubilizing. *Bacillus* 1N, isolated from yerba mate stems, represents a promising growth promoting bacteria, and will be considered for future *in planta* studies. This is not surprising since both genera have been extensively studied for their growth promoting activities (Bacon and Hinton 2006; Zhao et al. 2014; Rybakova et al. 2015).

In this work we analyzed the culturable endophytic community. We are aware that fastidious or unculturable microorganisms might not be detected by culture-dependent approach. The predominant fungi and bacteria detected in yerba mate were similar to those reported in other works in which the same type of technique was used. Culture-independent methods would provide a better

understanding of the endophytic population and their interactions. However, the knowledge of the culturable endophytic community composition is of great value for the development of technologies for agricultural management, in particular those related to microorganism-based growth promotion since the isolates are available for activity and inoculation analyses. In this study, the potential of endophytic isolates for plant growth promotion was determined by assessing nitrogen fixation, phosphate solubilization, ACC deaminase gene detection and fungal antagonism. Apart from *Bacillus* isolates, strains of *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Brevundimonas* and *Paenibacillus* are to be considered as potential bacterial inoculants for having growth promoting activities. In particular, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* are strong candidates for biological control against *Fusarium* sp.. This results could be the bases of developing strategies for improving yerba mate production with minimum needs of agrochemicals and therefor less aggressive with the environment.

**Acknowledgments** The authors would like to thank Ing. Dora Barreto for the invaluable help in fungi isolation and identification. M. Collavino, P. Sansberro, L. Mroginski, and E. Galdeano are members of the Research Council of Argentina (CONICET).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alippi AM, Aguilar OM (1998) Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *J Invertebr Pathol* 72:21–27
- Araujo WL, Marcon J, Maccheroni W Jr, Elsas JDV, Azevedo JL (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in *Citrus* plants. *Appl Environ Microbiol* 68:4906–4914. doi:10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002
- Bacon CW, Hinton DM (2006) Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-associated bacteria*. Springer, The Netherlands, pp 155–194. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7\_5
- Bacon CW, Glenn AE, Hinton DM (2002) Isolation, in planta, detection, and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Hurst CJ, Crawford RL, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD (eds) *Manual of environmental microbiology*, 2nd edn. ASM Press, Washington, pp 543–553
- Bangera MG, Thomashow LS (1996) Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2–87. *Mol Plant Microbe Interact* 9:83–90
- Bartholdy BA, Berreck M, Haselwandter K (2001) Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark

- septate fungal root endophyte. *Biometals* 14:33–42. doi:[10.1023/A:1016687021803](https://doi.org/10.1023/A:1016687021803)
- Blaha D, Prigent-Combaret C, Mirza MS, Moenne-Loccoz Y (2006) Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* 56:455–470
- Bowman KO, Hutcheson K, Odum EP, Shenton LR (1971) Comments on the distribution of indices of diversity. In: Patil GP, Pielou EC, Waters WE (eds) *Many species populations, ecosystems, and systems analysis. Statistical ecology 3*. Penn State University Press, Harrisburg, pp 315–366
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A (2014) Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 27:30–37
- Carroll GC, Carroll FE (1978) Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can J Bot* 56:3034–3043. doi:[10.1139/b78-367](https://doi.org/10.1139/b78-367)
- Cenis JL (1992) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res* 20:9
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (2010) Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils* 46:727–738. doi:[10.1007/s00374-010-0480-x](https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x)
- Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401–422. doi:[10.1146/annurev.micro.61.080706.093316](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316)
- Deng BV, Liu KH, Chen WQ, Ding XW, Xie XC (2009) *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:139–143. doi:[10.1007/s11274-008-9876-2](https://doi.org/10.1007/s11274-008-9876-2)
- Dhingra OD, Sinclair JB (1985) *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2014) *InfoStat versión 2014*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Ding T, Palmer MW, Melcher U (2013) Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. *BMC Microbiol* 13:1–11. doi:[10.1186/1471-2180-13-1](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-1)
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. *EMBRAPA-SPI, Brasília*, pp 11–60
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980) *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London
- Dourado MN, Andreote FD, Dini-Andreote F, Conti R, Araujo JM, Araujo WL (2012) Analysis of 16S rRNA and *mxrF* genes revealing insights into *Methylobacterium* niche-specific plant association. *Genet Mol Biol* 35:142–148
- Ellis MB (1971) *Dematiaceae hyphomycetes*. CAB International Mycological Institute, Kew
- Ellis MB (1976) *More dematiaceae hyphomycetes*. CAB International Mycological Institute, Kew
- El-Shatory SA, El-Kraly OA, Trujillo ME, El-Kazzaz WM, Gamal El-Din E, Dewedar A (2013) Generic and functional diversity in endophytic actinomycetes from wild Compositae plant species at South Sinai–Egypt. *Res Microbiol* 164:761–769
- Ferreira A, Quecine MC, Lacava PT, Oda S, Azevedo JL, Araujo WL (2008) Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett* 287:8–14. doi:[10.1111/j.1574-6968.2008.01258.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01258.x)
- Filip R, Lopez P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G (2001) Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72:774–778. doi:[10.1016/S0367-326X\(01\)00331-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00331-8)
- Fisher PJ, Petrini O, Sutton BC (1993) A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia* 45:338–345
- Fokkema NJ (1978) Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Ann Appl Biol* 89:115–119
- Gagne-Bourgue F, Aliferis KA, Seguin P, Rani M, Samson R, Jabaji S (2013) Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *J Appl Microbiol* 114:836–853. doi:[10.1111/jam.12088](https://doi.org/10.1111/jam.12088)
- Grichko VP, Glick BR (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem* 39:11–17
- Guo L-D, Huang G-R, Wang Y (2008) Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling mountains, Beijing. *J Integr Plant Biol* 50:997–1003. doi:[10.1111/j.1744-7909.2008.00394.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00394.x)
- Hamayun M, Khan SA, Ahmad N, Tang D-S, Kang S-M, Na C-I, Sohn E-Y, Hwang Y-H, Shin D-H, Lee B-H, Kim J-G, Lee I-J (2009) *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World J Microbiol Biotechnol* 25:627–632. doi:[10.1007/s11274-009-9982-9](https://doi.org/10.1007/s11274-009-9982-9)
- Hanada RE, Pomella AW, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO (2010) Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflora* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biol* 114:901–910. doi:[10.1016/j.funbio.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.006)
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piche Y (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant Microbe Interact* 15:233–242
- Iniguez AL, Dong Y, Triplett EW (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1078–1085
- Jin H, Yang XY, Yan ZQ, Liu Q, Li XZ, Chen JX, Zhang DH, Zeng LM, Qin B (2014) Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. *Syst Appl Microbiol* 37:376–385
- Jumpponen A, Jones KL (2010) Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytol* 186:496–513. doi:[10.1175/2010JCLI3208.1](https://doi.org/10.1175/2010JCLI3208.1)
- Kharwar RN, Gond SK, Kumar A, Mishra A (2010) A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1941–1948. doi:[10.1007/s11274-010-0374-y](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0374-y)
- Kim C-K, Eo J-K, Eom A-H (2013) Diversity and seasonal variation of endophytic fungi isolated from three conifers in Mt. Taehwa, Korea. *Mycobiology* 41:82–85. doi:[10.5941/MYCO.2013.41.2.82](https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.2.82)
- Klement Z (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199:299–300
- Kuldau G, Yates IE (2000) Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: Bacon CW, White JF Jr (eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, pp 85–117
- La Mondia JA, Taylor GS (1987) Influence of the tobacco cyst nematode (*Globodera tabacum*) on *Fusarium* wilt of Connecticut broadleaf tobacco. *Plant Dis* 71:1129–1132
- Lacava PT, Li W, Araujo WL, Azevedo JL, Hartung JS (2007) The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *J Microbiol* 45:388–393
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, Ames

- Lindow SE, Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69:1875–1883
- Luna C, Acevedo R, Collavino M, Gonzalez A, Mroginski L, Sansberro P (2013) Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:326–332. doi:10.1007/s11627-013-9500-5
- Lysiak E (2012a) Los cuatro principales eslabones de la cadena de la yerba mate. In: Bongiovanni R, Morandi J, Troilo L (eds) Competitividad y calidad de los cultivos industriales: Caña de azúcar, mandioca, maní, tabaco, té y yerba mate. Ediciones INTA, Cordoba, pp 189–198
- Lysiak E (2012b) Escenario del mercado de la yerba mate 2011. In: Bongiovanni R, Morandi J, Troilo L (eds) Competitividad y calidad de los cultivos industriales: Caña de azúcar, mandioca, maní, tabaco, té y yerba mate. Ediciones INTA, Cordoba, pp 198–205
- Ma B, Lv X, Warren A, Gong J (2013) Shifts in diversity and community structure of endophytic bacteria and archaea across root, stem and leaf tissues in the common reed, *Phragmites australis*, along a salinity gradient in a marine tidal wetland of northern China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:759–768
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, As T (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot Bull Acad Sin* 45:315–324
- Magnani GS, Didonet CM, Cruz LM, Picheth CF, Pedrosa FO, Souza EM (2010) Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genet Mol Res* 9:250–258
- McCully ME (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust J Plant Physiol* 28:983–990. doi:10.1071/PP01101
- Mehta S, Nautiyal CS (2001) An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr Microbiol* 43:51–56
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170:265–270
- Osono T (2008) Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. *Mycologia* 100:387–391. doi:10.3852/07-110R1
- O'Sullivan DJ, O'Gara F (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev* 56:662–676
- Pimentel IC, Kuczkowski FR, Chime MA (2006) Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil). *Floresta* 36:123–128
- Porras-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49:291–315. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081831
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 19:827–837. doi:10.1094/MPMI-19-0827
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araujo WL, Dos Santos DR, Azevedo JL (2005) Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int J Biol Sci* 1:24–33
- Rybakova D, Wetzlinger U, Müller H, Berg G (2015) Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* strain sb3-1, a soilborne bacterium with antagonistic activity toward plant pathogens. *Genome Announc* 3:e00052-15. doi:10.1128/genomeA.00052-15
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998) Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29:319–343
- Sansberro PA, Rey HY, Bernardis A, Luna C, Collavino M, Mroginski LA (2000) Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. *Biocell* 24:53–63
- Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM (2005) Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide dependent mechanism. *Clin Nutr* 24:360–366. doi:10.1016/j.clnu.2004.11.013
- Scholtysik A, Unterseher M, Otto P, Wirth C (2013) Spatio-temporal dynamics of endophyte diversity in the canopy of European ash (*Fraxinus excelsior*). *Mycol Prog* 12:291–304. doi:10.1007/s11557-012-0835-9
- Schulz B, Boyle C (2006) What are endophytes? In: Schulz B, Boyle CJ, Sieber TN (eds) *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin, pp 1–13
- Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, Salati F, Duarte MCT (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J Microbiol Biotechnol* 22:1185–1195. doi:10.1007/s11274-006-9160-2
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $15\text{ N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. *Mol Plant Microbe Interact* 14:358–366. doi:10.1094/MPML.2001.14.3.358
- Shiono Y, Tsuchinari M, Shimanuki K, Miyajima T, Murayama T, Koseki T, Laatsch H, Takanami K, Suzuki K (2007) Fusaristatins A and B, two new cyclic lipopeptides from an endophytic *Fusarium* sp. *J Antibiot* 60:309. doi:10.1038/ja.2007.39
- Suryanarayanan TS, Vijaykrishna D (2001) Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Divers* 8:155–161
- Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, De Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Bivin-Masson C, Dreyfus B (2001) Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183:214–220. doi:10.1128/JB.183.1.214-220.2001
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Thomas P, Kumari S, Swarna GK, Gowda TKS (2006) Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host–endophyte interaction in vitro and in vivo. *Can J Microbiol* 53:380–390. doi:10.1139/W06-141
- Videira SS, de Araujo JL, da Rodrigues LS, Baldani VL, Baldani JJ (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 293:11–19. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01475.x
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press Inc, New York, pp 315–322
- Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song H, Tan X, Sun L, Sangare L, Folly YME, Liu Y (2014) Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 9:e92486. doi:10.1371/journal.pone.0092486

- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarik D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK (2002) Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *App Environ Microbiol* 68:2198–2208. doi:[10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002)
- Zum Felde A, Pocasangre LE, Carnizares Monteros CA, Sikora RA, Rosales FE, Riveros AS (2006) Effect of combined inoculations of endophytic fungi on the biocontrol of *Radopholus similis*. *Info Musa* 15:12–17