



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Campo Experimental Villarino C.C. N° 14
S2125ZAA | Zavalla | Santa Fe | Argentina
Tel/Fax: +54 0341 497-0080
www.fcagr.unr.edu.ar
agro@unr.edu.ar



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

HONGOS ENDOFITOS PRESENTES EN ESPECIES FORRAJERAS DE LA
REGIÓN PAMPEANA, EVALUACION DE SU POTENCIAL COMO AGENTES
ANTAGONICOS Y PRODUCTORES DE METABOLITOS BIOACTIVOS

ADRIANA GARCIA LEMOS

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN MANEJO Y
CONSERVACIÓN RECURSOS NATURALES.

DIRECTOR (A): DRA SILVINA FELITTI

CO- DIRECTOR (A): DRA ELENA GÓMEZ

2015

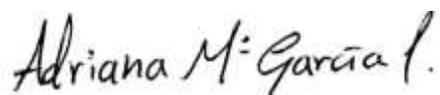
HONGOS ENDOFITOS PRESENTES EN ESPECIES FORRAJERAS DE LA
REGIÓN PAMPEANA, EVALUACION DE SU POTENCIAL COMO AGENTES
ANTAGONICOS Y PRODUCTORES DE METABOLITOS BIOACTIVOS

Adriana García Lemos.

Bióloga- Universidad del Valle.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Manejo y Conservación Recursos Naturales, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, en Zavalla- Santa Fe, durante el período comprendido entre los años 2011- 2013, bajo la dirección de la Dra Silvina Andrea Felitti y la co-dirección de la Dra Elena Gómez.

Adriana García Lemos.



Directora: Dra Silvina Felitti

Firma

Co-directora: Dra Elena Gómez

Firma

Defendida: 27 de abril de 2015.

AGRADECIMIENTOS.

- ❖ A mi Directora Dra Silvina Andrea Felitti, quien brindó sus conocimientos, amistad y recomendaciones con total disposición y colaboración, que con optimismo facilitó todas las herramientas para poder llevar a cabo este proyecto y por haber incrementado en mí la pasión por la biología y la investigación científica.
- ❖ A mi Co-directora Dra Elena Gomez, que con su guía, amistad, constante apoyo y confianza me permitió poder emprender este proyecto en Argentina, conformar un equipo de trabajo agradable y muy colaborador junto con Silvina.
- ❖ Al Dr Guillermo Labadie, que me abrió las puertas del instituto IQUIR para poder desarrollar parte del proyecto con su guía, dedicación, interés y constante apoyo. Al igual que su equipo de trabajo dentro del laboratorio del instituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, quienes me ayudaron durante mi estadia en el laboratorio con gran disposición.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, por brindarme esta valiosa oportunidad de poder estudiar y desarrollar mí proyecto de tesis, por el apoyo brindado a lo largo de este tiempo.
- ❖ Al Ing Agr. Marcelo Larripa, por su interés, acompañamiento y apoyo en el proyecto fue posible coordinar los muestreos dentro de la Facultad de Ciencias agrarias.
- ❖ Al Ing Agr. Julio Galli docente de la Facultad, por compartirme sus conocimientos sobre el tema de la tesis y por sus recomendaciones.
- ❖ A los dueños de Dulces del Jardín en la localidad de Funes por permitir realizar muestreos en sus predios de la granja orgánica, su interés y colaboración.
- ❖ A mis compañeros Alejandra Peruzzo, Gisela Green, Ignacio Carne, Lourdes Gil, Rodrigo Viassolo, por brindarme una grata amistad, facilitarme las cosas dentro del laboratorio, sus valiosos consejos y la compañía durante todo este período.
- ❖ A mis padres por todo lo que han hecho por mí, sus esfuerzos, dedicación, amor, toda la colaboración brindada a lo largo de todos estos años de estudio, gracias por apoyarme en todas mis decisiones.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron sus mayores esfuerzos para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano siempre en todo momento, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Mamá y Papá.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS, RECONOCIMIENTOS Y PUBLICACIONES.

1. 2012. Jornadas de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Rosario, Rosario-Argentina. 8 diciembre 2012. Presentación en calidad de poster titulado: "Hongos endófitos presentes en especies forrajeras de la Región Sur de Santa Fe y su potencial como productores de metabolitos bioactivos para el control biológico de plagas".
2. 2013. Congreso Argentino de Microbiología y II Congreso de microbiología agrícola y ambiental, Asociación Argentina de Microbiología (AAM), 23 al 26 de septiembre de 2013, Paláis Rouge, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. Presentación en calidad de poster titulado: "*Hongos endófitos presentes en especies forrajeras de la Región Sur de Santa Fe y su potencial como agentes de control biológico*".
3. Mención Especial en los premios Senasa Argentina a la Investigación y Transferencia en Protección Vegetal 2014 de Equipos Consolidados al proyecto "*Hongos endófitos presentes en especies forrajeras y su potencial como productores de metabolitos bioactivos*" dirigido por Silvina Andrea Felitti con lugar de desarrollo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario.

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue: i) estudiar la presencia de hongos endófitos en plantas forrajeras de *Paspalum dilatatum*, *P. notatum*, *Bromus catharticus*, *B. biebersteinii*, *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum*, todas especies de gramíneas características de la Región Pampeana, ii) evaluar el potencial antagonico de distintas cepas endófitas aisladas frente a hongos patógenos, iii) extraer y analizar los metabolitos secundarios producidos por cepas endófitas y evaluar su posible efecto inhibitorio contra patógenos fúngicos. Se tomaron muestras de las especies vegetales en las localidades de Zavalla y Funes, del sur de la provincia de Santa Fe. Los principales taxa de hongos aislados pertenecen a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Stemphylium*. La localidad de Funes presentó la mayor cantidad de cepas fúngicas aisladas. La especie *B. catharticus* presentó el mayor porcentaje de infección, seguida por la especie *P. dilatatum*, mientras que las muestras colectadas de *F. arundinacea* y *L. multiflorum* no presentaron infección. Se evaluó el efecto antagonico de cepas aisladas del género *Acremonium* frente a cepas fúngicas potencialmente patógenas. *Acremonium* sp.3 (033) presentó la mayor actividad antagonica mostrando un 91,42% y 91,35% de porcentaje de inhibición de crecimiento (PGI) frente a *Alternaria alternata* y a *Alternaria* sp., respectivamente. El efecto antagonico de esta cepa de *Acremonium* presentó diferencias significativas y varió dependiendo de la cepa a la cual fue enfrentado y del mecanismo de acción antagonica involucrado. Se evidenciaron dos posibles mecanismos: micoparasitismo y producción de metabolitos o toxinas fúngicas por competencia. Las pruebas de actividad antimicrobiana mostraron actividad positiva de los extractos fúngicos contra el crecimiento de cepas de *Alternaria*, *Curvularia* y *Fusarium*. Los extractos analizados por cromatografía en capa delgada (TLC) mostraron perfiles con diferentes Rf cuando se compararon dos solventes de corrida. Las cepas de *Acremonium* spp. caracterizadas en este estudio, son buenas candidatas para el control biológico de especies patógenas de pasturas. Hasta donde sabemos, este estudio es el primer reporte de especies del género *Acremonium* asociadas a *Paspalum dilatatum* y *P. notatum* en el país, y presenta uno de los primeros análisis de antagonismo de especies endófitas estudiadas en Argentina.

Palabras clave: *Acremonium* spp., control biológico, *Paspalum dilatatum*, *Paspalum notatum*, *Bromus biebersteinii*, *Bromus catharticus*, metabolitos secundarios fúngicos.

ENDOPHYTIC FUNGI FROM FORAGE PLANTS IN THE PAMPEAN REGION,
EVALUATION OF THEIR POTENTIAL AS ANTAGONISTIC AGENTS AND PRODUCERS
OF BIOACTIVE METABOLITES.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the presence of endophytes in forages in the southern region of Santa Fe, evaluate the potential of endophytic fungi as antagonistic agents against pathogenic fungi. The most abundant isolated taxa belonged to the genus *Acremonium*. The grass species *B. catharticus* had the highest percentage of endophyte infection. The endophytic isolates of the genus *Acremonium* showed antagonistic activity against different fungal pathogenic strains tested. *Acremonium* sp.3 (033) showed the highest antagonistic activity with a percent growth inhibition of 91.42 % and 91.35 % for *Alternaria alternata* and *Alternaria* sp., respectively. Significant differences between the treatments pathogen vs antagonists were found. These results could imply that the antagonistic effect of strain of *Acremonium* is specific within species. Two possible mechanisms were evidenced: mycoparasitism and production of metabolites or fungal toxins during competition. The antimicrobial activity tests showed positive activity of the fungal extracts against the growth of certain pathogenic strains tested. To our knowledge, this work also presents the first reported studies of the antagonistic effects of the endophytic species studied in Argentina, as well as the first report of the genus *Acremonium* species associated with *Paspalum dilatatum* and *Paspalum notatum* in the country.

Key words: *Acremonium* spp., Biological control, *Paspalum dilatatum*, *Paspalum notatum*, *Bromus biebersteinii*, *Bromus catharticus*, fungal secondary metabolites.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE FIGURAS	10
1. INTRODUCCION	12
2. MARCO TEORICO	14
2.1. SISTEMA DE PASTIZAL EN ARGENTINA.....	14
2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE GRAMÍNEAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.....	15
2.2.1. PASPALUM DILATATUM (POIR).....	16
2.2.2. PASPALUM NOTATUM (FLÜGGÉ).....	16
2.2.3. BROMUS CATHARTICUS (VAHL CATHARTICUS).....	17
2.2.4. BROMUS BIEBERSTEINII (ROEMER & SCHULTES).	18
2.2.5. FESTUCA ARUNDINACEA (SCHREB).	18
2.2.6. LOLIUM MULTIFLORUM (LAM).	19
2.3. HONGOS ENDÓFITOS: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS.	20
2.3.1. DEFINICIÓN DEL TÉRMINO HONGO ENDÓFITO.....	20
2.3.2. CICLO DE VIDA Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.	20
2.4. SIMBIOSIS PLANTA-HONGO ENDÓFITO.	21
2.5. ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS EN AMÉRICA DEL SUR.....	24
2.5.1 ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LOS HONGOS ENDÓFITOS EN ARGENTINA.....	25
2.6. CONTROL BIOLÓGICO.	26
2.7. HONGOS ENDÓFITOS COMO PRODUCTORES DE METABOLITOS BIOACTIVOS.	29
3. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GENERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. HIPÓTESIS.....	34
5 MATERIALES Y METODOS	35
5.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	35
5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO.....	35
5.2. DETECCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS.....	37
5.3. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS.....	38
5.4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ENDÓFITOS FÚNGICOS.....	40
5.5. PRUEBA DE ANTAGONISMO- CULTIVO DOBLE.....	41
5.6. SELECCIÓN DE PATÓGENOS PARA CULTIVOS DOBLES.....	43
5.6.1. ANTAGONISTAS USADOS.....	43
5.7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	43
5.8. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS.....	44
5.8.1. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS FÚNGICOS A PARTIR DE CULTIVOS EN MEDIO LÍQUIDO SM.....	45
5.8.2. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS FÚNGICOS A PARTIR DE MICELIO CRUDO.....	45
5.8.2.1. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS FÚNGICOS DE LAS CEPA ENDÓFITAS ACROMONIUM SP.4 (040) AC Y ASPERGILLUS NIGER (024) EN CULTIVO PURO EN MEDIO PDA.....	45

5.8.2.2. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS FÚNGICOS DE LA CEPA ANTAGONISTA <i>ACREMONIUM SP.4 (040) (Ex)</i> EN EL CULTIVO DUAL CONTRA LA CEPA <i>ALTERNARIA SP.1 (031)</i>	46
5.9. CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)) DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS.	46
5.10. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA (ESI-QTOF).	47
5.11. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CON LOS EXTRACTOS FÚNGICOS OBTENIDOS.....	48
5.11. ANÁLISIS DE DATOS.	49
6. RESULTADOS	50
6.1. ESPECIES FÚNGICAS AISLADAS DE LAS GRAMÍNEAS ESTUDIADAS.....	50
6.3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA IN VITRO.	55
6.4. PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS.	59
6.5. PERFILES CROMATOGRÁFICOS EN CAPA DELGADA (TLC) DE LOS EXTRACTOS.	62
6.6. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA (ESI-QTOF).	64
6.7. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, TÉCNICA DE “EXCAVACIÓN- PLACA- CULTIVO” DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS CONTRA CEPAS FÚNGICAS FITOPATÓGENAS.	64
7. DISCUSION	67
7.1. HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE ESPECIES FORRAJERAS	67
7.2. EVALUACIÓN DE CEPAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE CEPAS PATÓGENAS FÚNGICAS. PRUEBAS DE ANTAGONISMO- CULTIVOS DOBLES	70
7.3. PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS FÚNGICOS.	74
7.4. PERFILES CROMATOGRÁFICOS EN CAPA DELGADA (TLC) DE LOS EXTRACTOS.	75
7.5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS.	77
7.6. CONSIDERACIONES FINALES.	80
8. CONCLUSIONES.	81
9. BIBLIOGRAFÍA	83
10. ANEXOS	101
ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO PARA LA OBTENCIÓN DE MICELIO Y EXTRACTOS FÚNGICOS.	101
1.1. MEDIO LÍQUIDO M102 (PROTOCOLO DE BACON Y WHITE, 1994).	101
1.2. MEDIO LÍQUIDO SM (PROTOCOLO DE BACON Y WHITE, 1994).	102
ANEXO 2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES DE HONGOS ENDÓFITOS Y PATÓGENOS AISLADOS. .	103
ANEXO 3.	133
3.1. ESPECTROS DE MASA DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS FÚNGICOS DE LAS CEPAS DE <i>ACREMONIUM SPP.</i> EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	133
3.2. ESPECTROS DE MASA DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS FÚNGICOS DE LAS CEPAS DE <i>ASPERGILLUS SP1.</i> Y <i>A. NIGER.</i>	136
ANEXO 4. FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS DE <i>CURVULARIA CLAVATA</i> EN CULTIVO DOBLE CON <i>ACREMONIUM SP. (050)</i>	138

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Especies de hongos endófitos y patógenos aislados de gramíneas colectadas en cada zona de muestreo.....	51-52
Tabla 2. Efecto de los posibles antagonistas en la inhibición del crecimiento in vitro de patógenos de <i>Bromus catharticus</i> , <i>Paspalum dilatatum</i> y <i>P. notatum</i>	57
Tabla 3. Cepas endófitas utilizadas para la producción de metabolitos secundarios, características de los medios de cultivo y de los extractos fúngicos obtenidos.....	61
Tabla 4. Pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos.....	65

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1a y 1b. Estructuras moleculares de las cuatro clases principales de alcaloides producidos por los hongos endófitos del grupo <i>Clavicipitaceous</i>	33
Figura 2. Representación esquemática de la ubicación de la zona de muestreo 1 y de las sub-zonas de muestreo descritas, dentro del campo experimental J.F Villarino	37
Figura 3. Granja Orgánica “Dulces del Jardín” en la localidad de Funes- Santa Fe.....	38
Figura 4 Fotografía microscópica (100x) de corte de hoja de <i>Paspalum notatum</i> con tinción de azul de metileno.....	39
Figura 5. Aislamiento de hongos endófitos a partir de cortes de tallo y hoja.....	41
Figura 6. Técnica de microcultivo para la observación de la disposición de las estructuras fúngicas.....	42
Figura 7. Esquema representativo de un cultivo doble.....	43
Figura 8. Cultivos líquidos (medios M102 y SM).....	45
Figura 9. Esquema representativo de la técnica excavación- placa cultivo.....	49
Figura 10. Esquema general los procesos realizados.....	50
Figura 11. Porcentaje de plantas colectadas con hongos endófitos.....	52
Figura 12. Porcentaje de aislamientos de especies del género <i>Acremonium</i> según especie vegetal colectada.....	54
Figura 13. Cepas aisladas por género en las zonas de muestreo	55
Figura 14. Frecuencia de los principales géneros fúngicos aislados.....	55
Figura 15. Principales géneros fúngicos aislados por especie vegetal.....	56
Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio (PGI) de las cepas patógenas en los cultivos dobles frente a las cepas antagonistas	58

Figura 17. Cultivos dobles después de 3 semanas de inoculación a 28 °C.....	59
Figura 18. Cultivo doble de la cepa <i>Acremonium</i> sp.4 (040) frente a la cepa patógena <i>Alternaria</i> sp.1 (035).....	60
Figura 19. Cultivos líquidos de cepas endófitas en medio SM.....	61
Figura 20. Diagrama de las placas cromatográficas obtenidas de los compuestos fúngicos extraídos en AcOEt	64
Figura 21. Pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos.....	67

1. INTRODUCCION

El origen del término endófito proviene del siglo XIX; Antón de Bary lo utilizó para describir los hongos que viven en el interior de las plantas (De Bary, 1866). En la interacción planta-hongo endófito, generalmente se da origen a una relación de carácter permanente y obligado (Schulz y Boyle, 2005). Alrededor del 20 al 30% de las especies de pasturas a nivel mundial, forman simbiosis con hongos endófitos (Leuchtman, 1992). El simbionte fúngico se puede localizar en el vástago del hospedante estableciendo micofilas, en las cuales el endófito puede desarrollar todo su ciclo de vida dentro del hospedante o parte del mismo puede manifestarse externamente (Clay, 1990).

Las comunidades de hongos, incluidas las de endófitos, siguen una distribución log-normal (pocas especies abundantes y muchas especies raras) al igual que lo que sucede con las comunidades de macro-organismos (Lodge *et al.*, 1996; Gamboa *et al.*, 2005). Estas características, asociadas a lo relativamente fácil que es su muestreo y cultivo en el laboratorio, hacen de este grupo de organismos un buen modelo para estudios ecológicos y de biodiversidad (Gamboa, 2006).

Las prácticas agrícolas modernas han originado una reducción de la biodiversidad, conduciendo a un ecosistema artificial que requiere constante intervención humana por medio de aporte de agroquímicos, que además del incremento temporal de las producciones, originan costos sociales y medioambientales indeseables. Las pérdidas de producción debido a plagas y enfermedades, se cifran en alrededor del 20 al 30% para la mayoría de cultivos. Una agricultura sostenible reduce al mínimo el uso de pesticidas y fertilizantes, que perjudican el medio ambiente y la salud de los agricultores y consumidores (Altieri y Nicholls, 1999).

En Argentina, el desplazamiento de la ganadería a ambientes restrictivos, que se caracterizan por ser menos productivos y a su vez con una distribución de la producción de forraje más estacional, casi sin excepción, llevó a un proceso de sobrecarga de las pasturas y pastizales naturales. La situación actual es de fuertes desbalances entre la escasa oferta y la alta demanda de forrajes, sólo atenuada en períodos de alto crecimiento de las pasturas y pastizales, es decir, fines de primavera y verano (Bertín, 2009). La conservación de una variedad de especies de forrajes, ya sean gramíneas

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

La relación entre los pastizales nativos y los hongos endófitos es muy compleja, existe una variedad de interacciones (parasitismo, mutualismo, saprofitismo), que dependen tanto del tipo de especie hospedante, como de la especie endófito y de las condiciones medio ambientales. Estudios realizados en Argentina sobre la alta resistencia de plantas infectadas con endófitos frente a las defoliaciones periódicas, concuerdan con la hipótesis que los hongos endófitos podrían conferir ventajas para las especies hospedantes bajo condiciones de estrés (Iannone y Cabral, 2006).

Diversos estudios, tanto en campo como con las colecciones de herbario, han reportado que alrededor de 25 especies vegetales nativas de Argentina presentan infección endófito (Gentile *et al.*, 2005; Iannone *et al.*, 2011; Iannone *et al.*, 2102) y de acuerdo a características morfológicas analizadas y estudios filogenéticos, se han descrito dos especies endófitas asexuales de pastos de ciclo invernal en Argentina. Una de ellas es *Neotyphodium tembladerae*, la cual presenta un amplio rango de especies hospedantes de los géneros *Poa*, *Festuca*, *Bromus*, *Phleum* y *Melica* (Iannone y Cabral, 2006). La segunda es *N. pampeanum*, que está asociada a algunas poblaciones de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Iannone *et al.*, 2011). Sin embargo, los reportes de infección endófito de otros géneros de endófitos sobre especies de gramíneas en el país son escasos.

A pesar del aumento en el conocimiento sobre hongos endófitos en pastos nativos de Argentina durante los últimos años, es muy poco lo que se ha estudiado sobre su diversidad morfológica, distribución e incidencia en la mayoría de las especies vegetales hospedantes. Estudios recientes como los realizados por Iannone y Cabral, (2006); Iannone *et al.*, (2011; 2012), han abarcado estos aspectos y han detectado nueve nuevos hospedantes, con lo cual el número de especies reportadas para Argentina, como especies de pastos de ciclo invernal hospedantes asciende a 34 (Iannone *et al.*, 2011). Se han reportado aproximadamente 400 especies de pastos nativos de la subfamilia Pooideae y hasta la fecha, sólo se ha evaluado la incidencia de infección endófito en

alrededor de 200 especies. Por este motivo, existe poca información sobre la asociación endófitica con muchas especies de pastizales nativos y adicionalmente, son muchas las áreas en Argentina que continúan sin ser estudiadas respecto a las asociaciones de las plantas con hongos endófitos (Iannone *et al.*, 2011).

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

2. MARCO TEORICO

2.1. Sistema de pastizal en Argentina.

Los pastizales y sabanas del Cono Sur de América Latina poseen una valiosa diversidad biológica entre las que se destaca una variada flora y fauna autóctona, también son hábitat de especies en vías de extinción como el yagüareté, el ciervo de los pantanos y el oso hormiguero, entre otras especies (Chiossone, 2011). Desde el punto de vista ecológico, los pastizales de Argentina cumplen una importante función en el ecosistema, siendo reguladores de cuencas hídricas como la del complejo de Bermejo, Pilcomayo-Paraguay, Paraná, Río de La Plata desde el Oeste o el complejo Iguazú-Paraná desde el Este; los esteros del Iberá en Corrientes o las depresiones del Salado y Laprida en la Provincia de Buenos Aires. Los pastizales nativos y naturalizados tienen efecto positivo para la conservación y la revegetación del suelo, también son importantes reservorios de diversidad genética de especies forrajeras, se estima que en la región pampeana, la familia Poaceae incluye aproximadamente 190 especies nativas y 40 especies introducidas. A nivel productivo, los pastizales son destinados principalmente a la cría vacuna y ovina (Chiossone, 2011).

Los ecosistemas de pastizal ocupan más del 70% del territorio nacional Argentino, a pesar de encontrarse en retroceso debido a la extensión de la frontera agrícola. En la actualidad, los sistemas agrícolas en Argentina están basados en cultivos estivales con un marcado predominio de soja. Durante la última década, la carga animal de los campos de pastoreo se ha duplicado y en consecuencia, la vegetación natural ha sido fuertemente modificada provocando un empobrecimiento florístico. Para la sustentabilidad del sistema, es importante aumentar la proporción de gramíneas y así mejorar el aporte de materia orgánica y el balance de nutrientes (Chiossone, 2011).

En la región Sur de la provincia de Santa Fe, así como en la pampa deprimida de la provincia de Buenos Aires, la formación vegetal característica es el pastizal templado, el cual puede agruparse en comunidades vegetales correspondidas estrechamente con las condiciones edafo-topográficas. Las comunidades dominantes son: el flechillar de *Stipa*, *Piptochaetium*, *Bromus*, *Aristida*, *Briza*, *Poa*, *Paspalum*, *Panicum* y *Eragrostis*. En tanto que en los ambientes inundables, el pastizal de bajo se caracteriza por la presencia de gramíneas correspondientes a los géneros *Leersia*, *Paspalidium* y *Panicum* (Chiossone, 2011).

2.2. Descripción de las especies de gramíneas utilizadas en el estudio.

Las gramíneas pertenecen al orden Poales y a la familia Gramíneae o Poaceae, son plantas herbáceas, perennes o anuales. La familia Poaceae es la cuarta familia botánica con mayor riqueza de especies, con más de 670 géneros y cerca de 10.000 especies descritas y la primera familia en importancia económica mundial (Clayton *et al.*, 2002).

Dentro del proyecto, el estudio se centró en 6 especies de gramíneas nativas e introducidas y adaptadas de la Región Pampeana.

- *Paspalum dilatatum*
- *Paspalum notatum*
- *Bromus catharticus*
- *Bromus biebersteinii*
- *Festuca arundinacea*
- *Lolium multiflorum*

2.2.1. *Paspalum dilatatum* (Poir).

Paspalum dilatatum es una gramínea perenne tropical a subtropical, con metabolismo C4 y ciclo estivo-otoñal, originaria de América meridional. Es nativa de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay (García *et al.*, 2001). A nivel morfológico, presenta una inflorescencia con varias espigas tipo racimos conteniendo múltiples espiguillas diminutas, cada una de 2,8-3,5 mm de largo. Se halla en zonas húmedas y más especialmente en los subtrópicos, con lluvias superiores a 900 mm/año (USDA, 2013).

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

2.2.2. *Paspalum notatum* (Flüggé).

Paspalum notatum es una gramínea perenne tropical a subtropical presenta metabolismo C4. Se distingue por su prominente inflorescencia dual, en forma de V, Es nativa de América del Norte, México, Centroamérica (Belice, Costa Rica, El Salvador, Honduras), el Caribe (Antigua y Barbuda, Dominica, Granada, Martinica, San Cristóbal y Nieves, Santa Lucía, San Vicente y Granadinas, Trinidad y Tobago), y Suramérica (Guyana Francesa, Guyana, Surinam, Venezuela, Colombia, noreste Argentino, Brasil, este de Bolivia, Paraguay, Uruguay). Crece de 0 a 300 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Zuloaga y Morrone, 2005). En Argentina se encuentra distribuido en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Formosa, La Pampa, Mendoza, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Luis y Tucumán (Soreng *et al.*, 2003). Es una gramínea de lento crecimiento, formadora de estolones y gruesos y

escamosos rizomas, presenta entrenudos cortos y las raíces forman densas tramas radicales. Es una especie de hojas chatas, glabras, correosas, con láminas de 1 diámetro x 2-6 mm. Lígula anillada, densa, pelos cortos. Las bases foliares al término de cada rizoma usualmente tienen un matiz purpúreo, presenta un fruto cariopse oval, de 2,5 a 3,5 mm de largo (Clayton *et al.*, 2006).

P. notatum se encuentra naturalizado en muchos lugares del mundo, se asocia a suelos arenosos, tolerante de la sombra, salinidad y sequía extrema. Esta gramínea es valorada por su forma de estabilizadora de erosión, facilidad de establecerse y persistencia, además, presenta un mantenimiento relativamente bajo, con pocas enfermedades y problemas de insectos. Dadas sus características de resistencia, es usada como pastura para ganados y como pasto de jardín (Clayton *et al.*, 2006).

2.2.3. *Bromus catharticus* (Vahl catharticus).

Bromus catharticus pertenece al género de gramíneas *Bromus* C3, que incluye unas 100 especies anuales o perennes, distribuidas en regiones templadas (Hernández, 1970). La especie *B. catharticus* posee una raíz ramificada, tallo con nudos de tipo herbáceos, con láminas lineales planas, lanceoladas, paralelinervias, con presencia de lígula, la inflorescencia consiste en una panoja laxa. *B. catharticus* es una especie nativa de amplia distribución geográfica, en toda América. En Argentina presenta amplia distribución en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Rio Negro, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis, Tierra del Fuego y Tucumán (Soreng *et al.*, 2003).

La especie *B. catharticus* es una buena forrajera invierno-primaveral, presenta una alta productividad en suelos fértiles. Junto con otras especies del género *Bromus*, es el tipo de forraje más apropiado para el ganado vacuno, principalmente debido a su talla elevada, lo que la diferencia de otros géneros de gramíneas forrajeras (Hernández, 1970).

2.2.4. *Bromus biebersteinii* (Roemer & Schultes).

Bromus biebersteinii es una especie forrajera C3 de regiones templadas, presenta una altura de 50 a 100 cm con hojas simples, alternadas, lineales y con venación lineal y paralela, de 5-7 mm de ancho y de 20-35 cm de largo, pubescente en ambos lados, aurículas ausentes, lígula membranosa de aproximadamente 0,7 mm de longitud, rizomas cortos. La inflorescencia está arreglada en panículas erectas, las glumas son glabras de 7-13 mm de longitud, las semillas son similares en apariencia, presenta producción de cariopse (Ogle *et al.*, 2012).

Es una especie nativa de Asia occidental, introducida en Norte América en 1949 y distribuida ampliamente por todo el continente Americano. Dada su alta adaptabilidad a diferentes climas y suelos, es una gramínea usada a nivel mundial como forrajera para el ganado vacuno (Ogle *et al.*, 2012).

B. biebersteinii presenta susceptibilidad al patógeno *Ustilago bullata*, el cual ocasiona pérdidas por infección via semillas. Principalmente al primer año de cultivo, las semillas deben tratarse con fungicidas para eliminar las esporas adheridas antes de la siembra. Los tratamientos a la semilla sólo previenen la infección por parte de esporas, pero no controlan la infección si el suelo está contaminado (Foster *et al.*, 1996).

2.2.5. *Festuca arundinacea* (Schreb).

Festuca arundinacea es una especie con metabolismo C3 de regiones templadas, nativa de Europa y del norte de África. Es una forrajera muy importante en los sistemas de producción de ganado extensivos y es cultivada con ese fin en varios lugares del mundo como EE.UU., Argentina, Uruguay y Australia. En Argentina presenta amplia distribución en la provincias de Buenos Aires, Chubut, Entre Ríos, La Pampa, Neuquén y Tierra del Fuego (Soreng *et al.*, 2003). Morfológicamente, presenta una lígula membranosa, aurícula pequeña, hojas fuertemente surcadas, nervadura central pronunciada, las hojas están enrolladas en el nudo. Las láminas de las hojas son de 3 a 12 mm de ancho y de 1 a 6 cm de longitud, son prominentemente rugosas en la cara superior, y brillantes en el envés. Las hojas son más angostas en la punta y los márgenes son irregulares y cortantes al tacto (Cabrera, 1970).

Esta especie presenta dos épocas de siembra que dependen fundamentalmente del clima de la región. Puede sembrarse a fines del invierno, durante la primera quincena de septiembre. En este caso, la producción será baja en primavera pero óptima en el verano. Si se siembra en verano, la fecha más indicada es a fines de febrero para conseguir un buen establecimiento y poder competir con la vegetación espontánea (Cabrera, 1970).

Es muy comúnmente usada en tapices herbáceos poco tolerantes al calor, sequedad y sombra. Permanece verde todo el año y resiste muchas enfermedades, soporta muy bien el corte y persiste aunque haya bajo mantenimiento. La principal limitación productiva es la posible presencia de la enfermedad llamada festucosis. Se trata de una infección con el hongo endófito *Neotyphodium coenophialum*, que genera una intoxicación en los animales que la consumen, generando una serie de síntomas clínicos, que resultan en bajas en la producción de carne o leche, e incluso pueden producir la muerte de animales (Iannone *et al.*, 2011).

2.2.6. *Lolium multiflorum* (Lam).

Lolium multiflorum es una gramínea C3 de regiones templadas, conocida comúnmente como raigrás anual y se cultiva en muchos países para usarla como alimento para el ganado bovino. En Argentina presenta distribución en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Misiones, Neuquén, Rio Negro, Salta, Santa Cruz, Santa Fe, San Juan, San Luis, Tierra del Fuego y Tucumán (Soreng *et al.*, 2003). El raigrás anual presenta hojas de color verde claro casi amarillento, con los nervios de la hoja marcados y el envés muy brillante. La inflorescencia está formada por espiguillas sésiles, dispuestas alternativamente a lo largo del raquis floral. Las semillas poseen una arista (Cabrera, 1970).

Es la gramínea por excelencia para las praderas de corta duración, sola o asociada con el trébol violeta (*Trifolium pratense*), obteniéndose producciones rápidamente a partir de su establecimiento. Se utiliza en todo el mundo tanto para pradera de siega como de pasto. También se ha extendido su utilización como cultivo forrajero de invierno en regadíos y en ocasiones de secano. Existen variedades comerciales tetraploides que poseen ciertas cualidades como el tamaño de las semillas, mayor contenido de hidratos de carbono solubles y mayor resistencia a las royas, entre otros caracteres (Burkart, 1969).

El sistema radicular de *L. multiflorum* es muy superficial, lo cual lo hace sensible a las sequías. Necesita suelos fértiles en donde puede desarrollar todo su potencial de producción (Cabrera, 1970).

2.3. Hongos endófitos: definición y características.

2.3.1. Definición del término Hongo endófito.

El término *endófito* se conoce desde el siglo XIX, este término fue usado inicialmente para agrupar todos los organismos fúngicos que viven dentro de las plantas. El significado del término endófito, sobre el que aun existe cierta controversia, ha sido redefinido para incluir todos los organismos que, en algún momento de su ciclo de vida viven de manera asintomática dentro de tejidos vegetales vivos. Estos hongos pueden hallarse en espacios intercelulares, en los conductos del xilema e incluso en raíces, pero se los diferencia de las micorrizas porque no se observan hifas en el exterior de la raíz (Saikkonen *et al.*, 1998). En este trabajo de tesis denominamos endófitos a aquellos hongos que desarrollan todo su ciclo de vida, o una parte importante del mismo, de manera asintomática dentro de los tejidos vegetales. Por lo tanto, el término incluye a un amplio grupo de hongos que abarca tanto a saprófitos y patógenos que presentan períodos de latencia prolongados antes de la aparición de síntomas de enfermedad, como a hongos comúnmente asociados a gramíneas que son considerados mutualistas (Saikkonen *et al.*, 1998).

2.3.2. Ciclo de vida y clasificación taxonómica.

La mayoría de hongos endófitos constituyen infecciones internas localizadas en follaje, raíces, tallos y corteza y se transmiten horizontalmente vía esporas. Una fracción mucho más pequeña es transmitida verticalmente vía crecimiento de hifas en semillas (Saikkonen *et al.*, 1998). Los hongos endófitos establecen simbiosis que varían desde el mutualismo al antagonismo, desarrollando en sus hospedantes estrategias de vida que se conocen como del tipo I, II y III (Benavente *et al.*, 2008).

En el tipo I, el endófito se reproduce sexualmente, formando sus fructificaciones en reemplazo de las flores de sus hospedantes. En el tipo II, el simbiote fúngico también se reproduce sexualmente, pero fructifica sobre la epidermis de sus hospedantes. En el tipo

III, el endófito es de distribución sistémica y no se reproduce sexualmente, colonizando asintomáticamente al hospedante; su propagación tiene lugar a través de hifas presentes en los óvulos de la planta (White, 1988; Clay, 1998; Clay y Schardl, 2002). Las diferentes estrategias de vida (I, II y III) de los endófitos fúngicos, presentan distintos niveles de especificidad con respecto a los taxones involucrados en la simbiosis (Benavente *et al.*, 2008).

Los hongos endófitos pertenecen al grupo de los Ascomycetes (*Hypocreales*, *Clavicipitaceae*, tribus *Balansieae* y *Clavicipiteae*) y en términos generales tienden a clasificarse en dos grandes categorías: los *Clavicipitaceous* y los no *Clavicipitaceous*. El criterio normalmente usado para distinguir entre estas dos categorías ha sido recientemente revisado y reconsiderado (Summerbell *et al.*, 2011). Generalmente, la clasificación y el reconocimiento de estos dos grandes grupos se ha realizado basándose en la relación taxonómica y evolutiva, el rango de especies hospedantes y las funciones ecológicas. Los endófitos dentro del grupo de los *Clavicipitaceous* son generalmente un grupo reducido de endófitos Ascomycetes comúnmente asociados con la familia de pastos Poaceae. Al menos 7 géneros de endófitos *Clavicipitaceous* han sido identificados en pastos: *Atkinsonella* (Diehl), *Balansia* (Speg), *Balansiopsis* (Höhn), *Echinodothis* (G.F. Atk), *Epichloë* ((Fr.) Tul. y C. Tul), *Myriogenospora* (G.F. Atk), y *Parepichloe* (J.F. White y P.V. Reddy) (O'Hanlon *et al.*, 2012).

De los endófitos *Clavicipitaceous*, el género *Neotyphodium* (teleomorfo *Epichloë*) asociado con las gramíneas C3 de climas templados, es probablemente el más ampliamente distribuido y mejor estudiado hasta la fecha, mientras que los otros géneros endófitos han sido asociados a pastos tropicales C4 de la familia Poaceae (O'Hanlon *et al.*, 2012).

2.4. Simbiosis planta-hongo endófito.

La evidencia de la existencia de la simbiosis planta- hongo endófito ha sido ampliamente reportada (Carroll, 1995). Considerando las diferencias climáticas y biológicas entre regiones tropicales y templadas, es posible pensar que las tendencias de la simbiosis planta-hongo endófito sean diferentes en cada uno de estos escenarios y que la evolución biológica de la simbiosis se haya desarrollado de manera independiente. Se observa que

la composición de especies endófitas es muy diferente en la zona templada y en el trópico (Rodrigues y Petrini, 1997). Por ejemplo, uno de los taxones endófitos más comunes en los trópicos es la familia Xylariaceae, grupo que también es común en las zonas templadas pero donde se comportan como descomponedores de madera y no como endófitos (Petrini *et al.*, 1995). También se propone que la especificidad de hospedante es menos estricta en las zonas tropicales que en las templadas, aunque los datos son muy escasos (Gamboa, 2006).

Los hongos endófitos forman con sus hospedantes relaciones simbióticas complejas, confiriendo beneficios que pueden resultar mutuos: utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Salgado y Cepero, 2005). En la actualidad, existe un gran número de interrogantes acerca del funcionamiento de esta simbiosis y de los beneficios que recibe cada simbiote (Benavente *et al.*, 2008).

Existen hongos endófitos asociados a pastos de las zonas templadas como *Lolium* y *Festuca*, que les proveen protección contra herbivoría (interacción planta-animal) (Weis y Berenbaum, 1989). Este efecto está relacionado con la producción de toxinas por parte del hongo, el que a cambio recibe nutrientes, protección y en algunos casos, dispersión a través de la semilla de su hospedante (Clay, 1998). *Lolium perenne* es una de las especies de plantas más importantes para forraje, particularmente bien adaptada a climas templados. La mayoría de las especies del género *Lolium* pueden tolerar amplios rangos de condiciones climáticas y ambientales. Se ha inferido que estas características de resistencia por parte de *Lolium* se deben a su asociación con hongos endófitos, como es el caso de *Neotyphodium lolii*, el cual es un Ascomycete perteneciente a la familia Clavicipitaceae, simbiote obligado, que se reproduce asexualmente (Christensen *et al.*, 1993). Hahn *et al.*, (2007) demostraron que *N. loli* puede conferir protección a *Lolium perenne* frente al estrés hídrico y que los niveles de lolitremo B y ergovalina se vieron alterados en respuesta a este estrés abiótico de manera específica en cada asociación simbiótica.

En especies del género *Paspalum*, el hongo fitopatógeno *Claviceps paspali* es suprimido por la acción de diversos fitopatógenos del género *Fusarium*, el cual es transportado por polillas que actúan como vectores, las que son atraídas a la planta por los azúcares exudados producidos por *C. paspali* en *Paspalum* spp. (Feldman y O'Brien, 2008). En *Paspalum dilatatum* existen diversos hongos endófitos encontrados a nivel foliar, que

actúan como simbioses en plantas. Estas plantas mostraron una mayor resistencia a diversos ataques de fitopatógenos, entre ellos, otros hongos e insectos (Arias *et al.*, 2006). Muchos de estos hongos son reconocidos saprófitos que pueden estar en estado latente en la planta y actúan como descomponedores una vez que la planta ha muerto, influyendo en el proceso de sucesión ecológica (Lamb y Brown, 1970; Petrini *et al.*, 1995).

En especies forrajeras de *Bromus*, se ha reportado la asociación simbiótica de diversas *Fusarium torulosum*, y especies de los géneros *Curvularia* y *Penicillium*. Baynes *et al.*, (2012), realizaron un estudio midiendo el efecto de las asociaciones simbióticas del complejo endófitos-planta-nemátodos fungívoros, sobre la abundancia relativa de las especies de hongos endófitos en *Bromus tectorum*. Observaron el efecto del complejo simbiótico y cómo su alteración afecta la abundancia de hongos fitopatógenos y benéficos como las micorrizas. Por otro lado, se demostró que la simbiosis de *Bromus auleticus* con los endófitos *Neotyphodium* spp. confiere a la planta resistencia contra el patógeno *Ustilago bullata* (Vignale *et al.*, 2013).

El efecto protector de los endófitos sobre pastos de la zona templada, ha sido reportado por Johnson *et al.*, (1985), donde se usaron como herbívoros especies de áfidos y larvas de mariposa. La mortalidad del herbívoro fue mayor cuando se alimentaba de plantas infectadas, aunque se pudieron detectar efectos variados de acuerdo a la combinación áfido-planta (Johnson *et al.*, 1985). En 1998, Clay postuló otros beneficios para la planta hospedante de endófitos, como el aumento en el crecimiento y una mayor resistencia a organismos patógenos. Los estudios demuestran claramente que los endófitos causan efectos negativos en los herbívoros (Clay y Schardl, 2002), siendo de aceptación general el postulado de un mutualismo basado en la defensa contra herbivoría (Saikkonen *et al.*, 1998). Es común que los ensayos realizados usen especies introducidas y/o que rara vez interactúan en condiciones naturales (Benavente *et al.*, 2008).

Existen cambios que ocurren a nivel fisiológico dentro de las plantas a causa de la interacción con hongos endófitos: se produce un incremento en la tasa fotosintética y se promueve la absorción de fosfatos por parte de la planta, se incrementa el vigor de la semilla, se incrementa la tolerancia a condiciones medioambientales poco favorables para el desarrollo de las pasturas, como resistencia a sequía. Sin embargo, Gundel *et al.*, (2013) reportaron que los beneficios de la interacción planta-hongo endófito parecen ser altamente dependientes del cultivar del pasto, la cepa endófito y las condiciones ambientales. Por otra parte, Omacini *et al.*, (2011) reportaron una reducción de la biomasa

de la raíz de plantas hospedantes y del porcentaje de colonización micorrícica, y una producción significativa de exudados radiculares por la presencia de hongos endófitos. Sin embargo, la respiración del suelo y la descomposición de la hojarasca no se vieron afectadas significativamente (Omacini *et al.*, 2011).

Existen pocos reportes de interacciones simbióticas de las gramíneas con hongos no sistémicos pertenecientes al grupo de los no-*Clavicipitaceus*, sin embargo los reportes existentes, parecen indicar que existe un gran número de hongos no sistémicos asociados a gramíneas silvestres y cultivadas (Sánchez- Márquez *et al.*, 2012).

2.5. Antecedentes en el estudio de los hongos endófitos en América del Sur

La diversidad de los hongos endófitos ha sido ampliamente estudiada en América del Norte y Europa (White y Cole, 1985, 1986; White, 1988; Clay, 1989; White y Baldwin, 1992; Leuchtmann, 1992; Saikkonen *et al.*, 2000; Leyronas y Raynal, 2001; Iannone *et al.*, 2011). Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado en América del Sur sobre la diversidad de endófitos y sobre la simbiosis entre planta-hongo endófito (Iannone *et al.*, 2011).

Algunos avances se han realizado por medio de los estudios con plantas forrajeras. En particular, en el caso de *Brachiaria* se demostró que los áfidos prefieren alimentarse de plantas no infectadas con hongos endófitos, a causa de la producción de metabolitos tóxicos de origen fúngico (CIAT, 1998). Rojas *et al.*, (1995) realizaron un estudio en Chile, sobre el efecto del hongo endófito de *Festuca arundinacea* (*N. coenophialum*) sobre la ganancia de peso vivo en novillos a pastoreo. En este estudio se utilizaron pasturas de *F. arundinacea* con niveles de infección de endófito superiores al 60% las cuales fueron comparadas con pasturas libres de infección. El incremento en el peso vivo de los novillos mostró aumentos significativos cuando se alimentaron de *Festuca* libre de endófito, mientras que el menor aumento se registró con *Festuca* con endófito. Se concluyó que la infección de *Festuca* con el hongo *N. coenophialum* provoca menores incrementos de peso vivo de los animales que la consumen y una menor producción de peso vivo por hectárea (Rojas *et al.*, 1995).

En Brasil, Vaz *et al.*, (2009) examinaron la actividad antimicrobiana de los hongos endófitos aislados de las hojas, tallos y raíces de 54 especies de *Orchidaceae*, contra bacterias patógenas, en donde el 33% de los aislamientos presentaron actividad antimicrobiana contra al menos un microorganismo patógeno evaluado. Los resultados indicaron que los extractos de los hongos endófitos aislados de hojas de orquídeas de bosques semidesiertos fueron más activos en contra de *Escherichia coli* mientras que los extractos de los hongos endófitos aislados de las raíces de orquídeas rupícolas colectadas, presentaron mayor actividad antagonica contra *Candida krusei* y *Candida albicans*. En particular, una cepa de *Alternaria sp.* y una cepa de *Fusarium oxysporum* presentaron los más altos valores de efecto antibacteriano. Este estudio es el primer reporte del potencial bioactivo de los hongos endófitos asociados a especies tropicales de ecosistemas brasileños (Vaz *et al.*, 2009).

2.5.1 Antecedentes en el estudio de los hongos endófitos en Argentina.

En Argentina los hongos endófitos se han estudiado durante los últimos 25 años. Lischinsky *et al.*, (1990) publicaron un estudio sobre la detección de hongos endófitos en *Poa huecu* y *Festuca argentina*, en la provincia de Neuquén. Dentro de este proyecto también se muestrearon otras especies como *Stipa speciosa*, *Stipa humilis*, *Festuca pallescens* y *Hordeum comosum*. La presencia de hongos endófitos sólo se evidenció en *P. huecu* y en *F. argentina*, sugiriendo la posibilidad de que los hongos endófitos descritos estén vinculados a la toxicidad de estas dos especies (Lischinsky *et al.*, 1990). Se han aislado hongos endófitos asociados a varias poblaciones de pastos tóxicos para el ganado como *Festuca argentina*, *Poa huecu* y *Festuca hieronymi* y de pastos no tóxicos como *Poa rigidifolia*, *Festuca magellanica*, *Melica stuckertii*, entre otros (Gentile *et al.*, 2005). Todos los hongos aislados han mostrado características macro y micromorfológicas similares, que los clasifican dentro del género *Neotyphodium*. El estado sexual de este hongo (*Epichloë*) no ha sido encontrado en Argentina (Gentile *et al.*, 2005).

Cina *et al.*, (2010) presentaron un estudio sobre endófitos en gramíneas nativas de selvas del norte Argentino. Los autores realizaron un análisis filogenético utilizando las secuencias del gen *tubB* de endófitos aislados a partir de *Festuca parodii*, *Festuca superba*, *Festuca fimbriata* y *Bromus brachyanthera*. La caracterización morfológica indicó la presencia de diferentes entidades del género *Neotyphodium*. Gentile *et al.*, (2005)

investigaron la filogenia de 27 especies de *Neotyphodium* aisladas de 10 especies nativas de pastos en 22 poblaciones de Argentina. Por medio del análisis filogenético de secuencias, se infirió que los endófitos aislados son en su mayoría, híbridos ínterespecíficos de *Epichloë festucae* y *E. typhina*. Este resultado indica que la hibridación ínterespecífica que promueve la variación genética fue común durante la evolución de los endófitos en los pastos de Argentina (Gentile *et al.*, 2005). En pastizales de Argentina, Uruguay y el Sur de Brasil, se ha detectado el endófito *Neotyphodium* asociado al pasto perenne *Bromus auleticus*. El estudio realizado por Iannone *et al.*, (2011) apoya la hipótesis de que su estado sexual (*Epichloë*) no está representado en el hemisferio sur y sugiere la existencia de una diversidad muy alta de endófitos en estado asexual para América del Sur.

2.6. Control biológico.

Existen múltiples factores que afectan al establecimiento de especies forrajeras, como la adaptación al clima, la resistencia al pisoteo del ganado y la presencia de enfermedades en diferentes épocas del cultivo, entre ellas, la susceptibilidad a infección por bacterias, virus y hongos. Estos últimos son los principales causantes de enfermedad, produciendo daños sobre los rendimientos y alteraciones importantes en el producto cosechado que se evidencian en la lignificación de tallos, disminución de la digestibilidad de las paredes celulares y la producción de micotoxinas (Arias *et al.*, 2006), así como otros síntomas que afectan los rendimientos, entre ellos el marchitamiento de las plantas y el enanismo (Delgado y Alonso, 1994).

El control biológico es un método efectivo como alternativa para el control de fitopatógenos, definido por Baker, (1987) como la disminución de inóculo o la actividad de la especie patógena por la acción de uno o más organismos (agentes de control) incluyendo a la planta hospedante y excluyendo al hombre (Baker, 1987). Los agentes de control biológico presentan diversos mecanismos de acción que les permiten controlar patógenos, dentro de ellos se encuentran la producción de enzimas antibióticas, la competencia por nutrientes y la inducción de defensas propias de la planta hospedante (Narayanasamy, 2013). Dentro de los agentes de control biológico conocidos existe una gran variedad de especies de hongos endófitos (Clay, 1991).

Existen extensas revisiones bibliográficas que describen la lista de los endófitos que han sido reportados y usados en el tratamiento de semillas, limitando sustancialmente los efectos negativos del estrés biótico y abiótico en las plantas, protegiendo el tejido vegetal por supresión de organismos patógenos (Kobayashi y Palumbo, 2001; Backman y Sikora, 2008). Si bien los informes del efecto antifúngico de la simbiosis son escasos, se puede mencionar el estudio de la protección de plántulas contra el fitopatógeno *Rhizoctonia zeae* (Gwinn y Gavin, 1992), y el estudio que demostró los efectos antagónicos del endófito *E. typhina* contra el patógeno fúngico *Cladosporium phlei* (Shimanuki, 1987).

También existen algunos reportes que informaron sobre un posible efecto alelopático en *Festuca* mediado por el endófito *N. coenophialum* (Schardl *et al.*, 2004). Maciá-Vicente *et al.*, (2008) reportaron que diversos aislamientos endófitos de géneros fúngicos como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Phoma* fueron capaces de reducir *in vitro* síntomas causados por el patógeno de la raíz en cebada *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. En contraste, un posterior estudio realizado por los mismos autores, mostró que las especies endófitas del género *Fusarium* (*F. equiseti*) no presentaban efectos significativos sobre la enfermedad causada por *G. graminis* aunque se evidenció una reducción en la lesión (Maciá-Vicente *et al.*, 2008 y 2009, en O'Hanlon *et al.*, 2012).

Otro estudio mostró que *F. verticillioides* fue capaz de reducir la severidad del daño causado por *Ustilago maydis* en cultivos de maíz en invernadero, por medio del uso de una co-inoculación del endófito y una suspensión de esporas en plantas infectadas (Lee *et al.*, 2009 en O'hanlon *et al.*, 2012). Algunos trabajos han mostrado el efecto antagonista del endófito *Epichloa typhina* sobre *Cladosporium phlei*, patógeno fúngico causante de la enfermedad "mancha de las hojas" en *Phleum pratense* L. Se demostró que plantas infectadas con *E. typhina* fueron resistentes a la enfermedad producida por *C. phlei* (Medvescigh, 2004). También se ha mostrado una mayor resistencia en plantas de *Festuca alta* (*F. arundinacea*) infectadas con el endófito *N. coenophialum* contra la enfermedad "roya del tallo" producida por el patógeno fúngico *Puccinia graminis* L. y a la "roya de la hoja" *Puccinia coronata* (Medvescigh, 2004).

Por otro lado, los hongos endófitos también se han estudiado por sus características de conferir resistencia a plantas infectadas frente a ataques de herbívoros, lo que les brinda

a las mismas una ventaja adaptativa en competencia por espacio y recursos frente a plantas invasoras. Estudios recientes de Saikkonen *et al.*, (2013) han demostrado que la colonización endófitica en *Festuca pratensis* promueve la competencia y la dominancia de esta gramínea sobre especies invasoras. Se demostró que las plantas de *F. pratensis* infectadas con endófitos prevalecen sobre la invasión de malezas en monocultivos experimentales (Saikkonen *et al.*, 2013). La mayoría de los estudios enfocados en el control biológico con hongos endófitos, en general abordan la utilización de una sola especie como agente de control, a diferencia de lo que ocurre en condiciones naturales, en donde la planta puede expresar los beneficios de varios organismos que brindan protección. El uso de múltiples organismos que coexisten en los tejidos internos de la planta está empezando a ser considerado, demostrando que esta estrategia presenta un impacto efectivo en la sanidad vegetal (Backman y Sikora, 2008).

La energía empleada en la producción de biomasa del endófito es compensada por los beneficios que obtienen las plantas por la presencia de los hongos endófitos (Backman y Sikora, 2008). El posible uso de la combinación biológica (endófitos) y química (pesticidas comerciales) para el manejo de plagas en cultivos, puede dar lugar a un efecto sinérgico sobre uno o más agentes causantes de enfermedad. Los químicos pueden brindar supresión de enfermedades de manera rápida mientras que los agentes de control biológico pueden brindar un control continuo hasta bien entrado el ciclo de producción del cultivo. El empleo de organismos para el control biológico reduce costos de producción de semilla y presenta un menor impacto ambiental (Backman y Sikora, 2008).

Los sistemas de pastizales infectados con hongos endófitos deben ser reconocidos en los planes de cría y prácticas agrícolas, dadas las consecuencias para la sostenibilidad de los forrajes y su productividad. Este aspecto es válido para el caso de las cepas endófitas que no producen micotoxinas pero incrementan el crecimiento de la planta, la producción y germinación de semillas y la tolerancia al estrés abiótico, lo que conlleva a una mayor productividad de los cultivares usados como forrajes y la reducción de las poblaciones de malezas y especies invasoras (Saikkonen *et al.*, 2013).

2.6.1. Estrategias de control biológico.

Diversas investigaciones han mostrado que los mecanismos de biocontrol y las actividades de los agentes de control biológico (ACB) son numerosos. Los ACB pueden actuar de diversas formas para la supresión de agentes patógenos, ya sea por mecanismos primarios como parasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes o espacio, así como por la prevención de la colonización en tejidos específicos por patógenos, al producir una inducción local o sistémica de resistencia en las plantas susceptibles. Por otro lado, pueden promover el crecimiento de las plantas y fomentar la resistencia a patógenos microbianos (Narayanasamy, 2013).

El desarrollo de un agente patógeno dentro de la planta puede verse afectado mediante tres distintos tipos de antagonismo: antagonismo directo, antagonismo indirecto, o una combinación de ambos. En el antagonismo directo, el hongo antagonista benéfico es capaz de parasitar y matar al patógeno o sus propágulos, pudiendo penetrar y destruir las esporas de resistencia del patógeno. En el antagonismo indirecto, no existe contacto físico entre el agente antagónico y el patógeno y el ACB puede fomentar el nivel de resistencia del hospedante al activar sus sistemas de defensa. La competencia del ACB y el patógeno por nutrientes o espacio también es una forma indirecta, ya que el ACB debilita al patógeno y previene su acceso a los tejidos vegetales necesarios para su desarrollo. El tercer mecanismo de acción del ACB incluye la producción de distintos tipos de enzimas, antibióticos o metabolitos secundarios capaces de inhibir o suprimir los patógenos dentro de la planta (Narayanasamy, 2013).

2.7. Hongos endófitos como productores de metabolitos bioactivos.

Debido al potencial farmacéutico y tecnológico de sus metabolitos secundarios, los hongos se han estudiado por más de 70 años. Hasta ahora existen más de 4000 metabolitos fúngicos (Tan y Zou, 2001) y alrededor de 5000 a 7000 especies taxonómicas (Hibbett *et al.*, 2007), sin embargo, es mucho lo que todavía falta por conocer y estudiar considerando que los hongos son los organismos más abundantes, después de los insectos. Actualmente se estima que existen 5,1 millones de hongos y unos 8 millones de insectos (Blackwell, 2011). Los hongos son fuente importante de nuevos productos farmacéuticos, ofreciendo un enorme potencial para la búsqueda de nuevos compuestos,

para lo cual es importante tener en cuenta que los metabolitos secundarios que el hongo sintetiza varían dependiendo del taxón y del nicho ecológico, así como del biotipo del cual se aíslan, las diferencias de las condiciones climáticas y las diferencias entre las especies vegetales tropicales y de regiones templadas que los hongos infectan (Schulz *et al.*, 2002).

Actualmente, los hongos endófitos se consideran como una excelente fuente de metabolitos bioactivos, que inhiben o suprimen una amplia variedad de microorganismos, como bacterias, hongos, virus y protozoarios que afectan humanos y animales (Lowell *et al.*, 1997). Muchos de estos metabolitos bioactivos han sido probados por sus efectos protectores en las plantas donde la colonización endófitica puede mejorar la adaptabilidad ecológica de sus hospedantes, al aumentar la tolerancia al estrés ambiental debido a la producción de metabolitos antimicrobianos contra fitopatógenos (Okeke *et al.*, 1994). Una alta proporción de hongos endófitos produce componentes biológicamente activos con propiedades herbicidas, antibacteriales y fungicidas, de esta forma, proporcionan características favorables para el control biológico, crecimiento, mantenimiento y adaptación de las plantas (Tan y Zou, 2001).

Los metabolitos aislados de los hongos endófitos pertenecen a diversos grupos estructurales, incluyendo esteroides, xantonas, fenoles, isocoumarinos, derivados de perileno, quinonas, furandiones, terpenoides, depsipéptidos y cytoquinas (Schulz *et al.*, 2002) (Figura 1a). Algunos de estos metabolitos representan nuevos grupos estructurales, por ejemplo, las palmarumicinas y la benzopiranona. La proporción de nuevas estructuras producidas por endófitos es considerablemente alta (51%) comparada con la producida por los aislados del suelo, demostrando que los endófitos son una buena fuente de nuevos metabolitos secundarios y que estos metabolitos juegan un papel principal en la estrategia de vida de los hongos endófitos (Schulz *et al.*, 2002). El uso biotecnológico de algunos de estos productos está en etapa de desarrollo. Por ejemplo, el compuesto Rugulosin® producido por un endófito no esporulante presenta actividad contra el gusano de las yemas del abeto y esta sustancia podría ser producida comercialmente (Sumarah *et al.*, 2005).

Los hongos endófitos de pastos de ciclo invernal producen metabolitos específicos como peramina y lolina, los cuales proveen protección contra plagas de insectos y nematodos.

Por otro lado, algunos pastos como *Lolium arundinaceum* y *Lolium perenne* poseen hongos endófitos que acumulan alcaloides como lolitremo B y ergovalina (Figura 1b) que resultan tóxicos para el ganado (Schulz *et al.*, 2002; Scott, 2004). Los efectos de estos alcaloides incluyen toxicosis, necrosis, baja producción de leche, abortos, vasoconstricción, pérdida de peso, temperatura alta y supresión de prolactina (Gamboa, 2006). Los endófitos pueden acumular hasta 2500 mg kg-l de ergonovina y 400 mg kg-l de amida de ácido lisérgico, sustancias conocidas por tener actividades farmacológicas potentes (Bush *et al.*, 1997). La habilidad de muchas especies de hongos endófitos para sintetizar un amplio rango de metabolitos secundarios en la planta, constituye el mayor beneficio ecológico para estas simbiosis y presuntamente ha sido el factor más importante en la evolución de esta asociación mutualista. El alto grado de especificidad que existe en la interacción planta-hongo endófito sugiere la existencia de una co-adaptación. Sin embargo, la base del beneficio fisiológico que provee la simbiosis con endófitos es poco comprendida (Schardl, 1996).

Los hongos endófitos *Epichloë* spp. (sexuales) y sus derivados asexuales, *Neotyphodium* spp., producen un grupo de alcaloides bioactivos que incluye a los alcaloides de tipo ergot, las pirrol-opirazinas, las amino-pirrol-opirazinas y los indol-diterpenos (Bush *et al.*, 1997). Las peraminas y las lolinas son conocidas por sus propiedades insecticidas (Rowan *et al.*, 1986; Siegel *et al.*, 1990), mientras que la ergovalina y los lolitremos resultan tóxicos para el ganado (Gallagher *et al.*, 1984; Munday-Finch *et al.*, 1995; Parish *et al.*, 2003). El lolitremo B (un indol-diterpeno), es la toxina responsable de la enfermedad conocida como *ryegrass staggers*, un síndrome que afecta a animales que se alimentaron de *L. perenne* infectado con *N. lolii* (Gallagher *et al.*, 1981; 1984). La producción de lolitremo se identificó únicamente en pastos infectados con *Epichloë festucae*, *Neotyphodium lolii* y *Neotyphodium* sp. (FaTG-2) (Christensen *et al.*, 1993; Clay y Schardl, 2002). Se caracterizó un grupo de genes localizados en el locus *LTM* de *N. lolii* y *E. festucae* involucrado en la síntesis de indol-diterpenos (Young *et al.*, 2005; 2006). Este locus consiste en al menos 10 genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de indol-diterpenos. Además, se demostró que la expresión de estos genes *ltm* está co-regulada, con altos niveles de expresión cuando el endófito está asociado al hospedante (Young *et al.*, 2005; 2006).

Recientemente se secuenciaron los genomas de 10 especies del clado epichloae, tres de hongos productores de alcaloides de tipo ergot y dos especies relacionadas (Schardl *et*

al., 2013). Los autores compararon los loci que contienen los genes codificantes para las enzimas que participan en la biosíntesis de alcaloides y también analizaron los perfiles de estos compuestos sintetizados por cada una de las especies fúngicas. El análisis de estos loci de distintas especies fúngicas indicó que hay regiones conservadas que contienen a los genes cuyos productos participan en la síntesis de las estructuras básicas de los alcaloides. Además, se encontraron otras regiones menos conservadas en donde están incluidos los genes codificantes para enzimas que determinan las variaciones estructurales asociadas a la actividad biológica de cada alcaloide. Asimismo, se encontraron secuencias derivadas de transposones y bloques de secuencias repetidas ricos en AT. Basándose en la organización de los loci codificantes para alcaloides, Schardl *et al.*, (2013) propusieron que los hongos del clado epichloae se encuentran bajo una fuerte presión de selección tendiente a aumentar la diversificación de los alcaloides que producen.

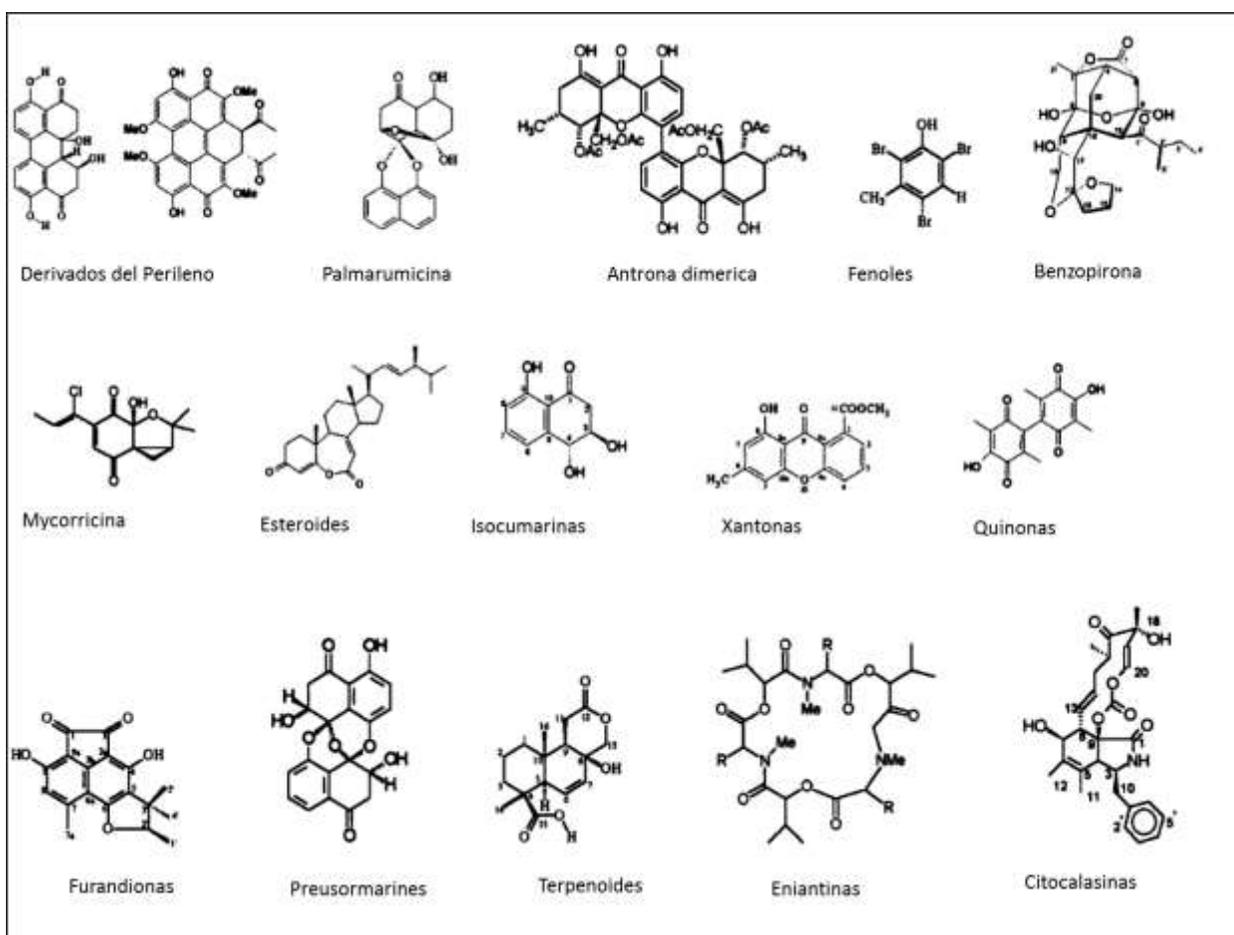


Figura 1a. Estructuras moleculares de los metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos. Principales grupos: fenoles, esteroides, cytochalasinas, quinonas, terpenoides entre otros. Fuente: Schulz *et al.*, 2002.

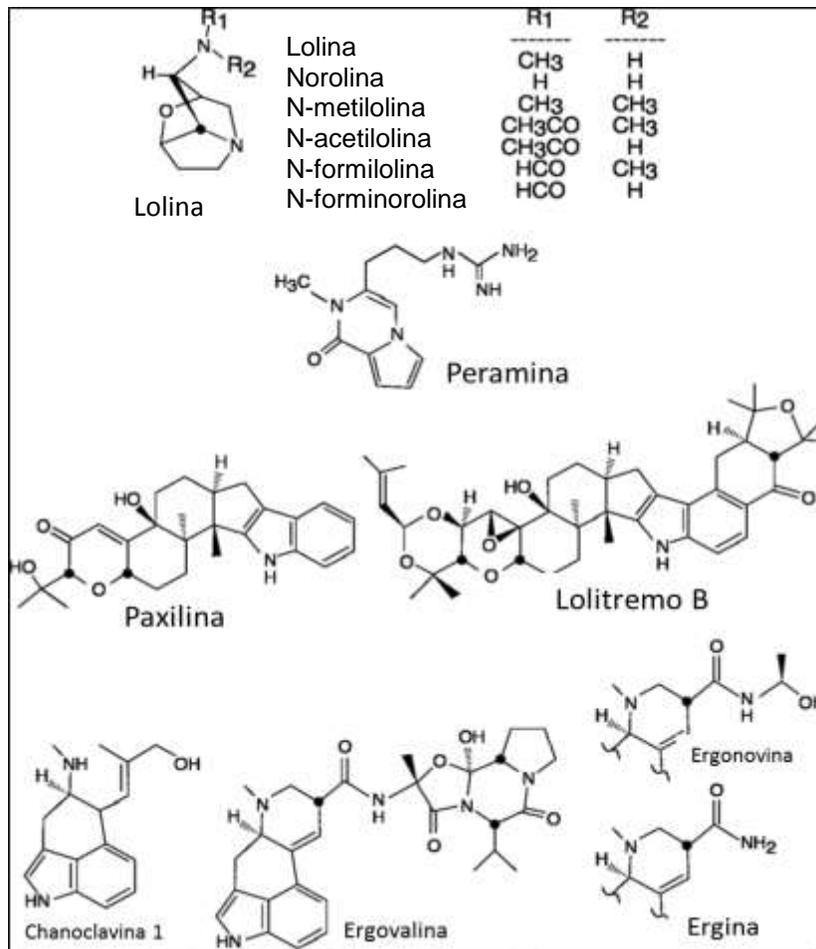


Figura 1b. Estructuras moleculares de las cuatro clases principales de alcaloides producidos por los hongos endófitos del grupo Clavicipitaceus. Fuente: Schulz *et al.*, 2002.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Determinar la presencia de hongos endófitos en especies forrajeras de la Región Pampeana, e identificar y evaluar las especies de endófitos con potencial como antagonistas de especies fúngicas patógenas de gramíneas.

3.2. Objetivos Específicos.

1. Aislar e identificar taxonómicamente hongos endófitos en las especies forrajeras *Paspalum dilatatum*, *Paspalum notatum*, *Bromus catharticus*, *Bromus biebersteinii*, *Lolium multiflorum* y *Festuca arundinacea*, por medio de técnicas convencionales de aislamiento, cultivo de hongos filamentosos e identificación morfológica.
2. Evaluar *in vitro* el potencial de los hongos endófitos aislados como posibles antagonistas de cepas fúngicas patógenas de especies forrajeras por medio de enfrentamientos duales en cultivo.
3. Obtener extractos de cepas endófitas, evaluar *in vitro* su actividad antimicrobiana contra cepas patógenas y analizar los compuestos extraídos por medio de técnicas bioquímicas.

4. HIPÓTESIS.

1. Existen asociaciones simbióticas de distintas especies de hongos endófitos con especies forrajeras de la Región Pampeana
2. Los hongos endófitos, podrían actuar como agentes de control biológico contra diversos patógenos fúngicos de especies forrajeras y producir metabolitos bioactivos con potenciales beneficios para la planta hospedante por presentar actividad antimicrobiana

5 MATERIALES Y METODOS

5.1. Área de estudio.

Las colectas de especies vegetales se realizaron en dos zonas de la región sur de la provincia de Santa Fe, en las localidades de Zavalla (Zona1) y Funes (Zona 2). Los suelos de estas zonas están identificados como Argiudol vértico y Argiudol típico, respectivamente. El muestreo se realizó en los meses de marzo-abril y septiembre a diciembre del 2012; para colectas de *Paspalum dilatatum* (Poir), *Paspalum notatum* (Flüggé), *Bromus catharticus* (Roem. y Schult), *Bromus biebersteinii* (Roemer y Schultes) y de mayo a julio del 2012 para las colectas de *Festuca arundinacea* (Schreb) y *Lolium multiflorum* (Lam.). Se colectaron plantas enteras al azar, de las cuales, las plantas sin síntomas de enfermedad fueron consideradas para el aislamiento de endófitos, y las plantas colectadas que presentaron síntomas de infección (cambio de color, marchitamiento, necrosis) fueron consideradas para el aislamiento de hongos patógenos, que se usaron posteriormente en pruebas de antagonismo. Cada colecta fue realizada a una distancia de separación de 2 metros entre cada planta para evitar tomar muestras repetidas de un mismo genotipo (Sánchez-Márquez *et al.*, 2007)

5.1.1. Descripción de las zonas de muestreo.

Zona 1: Localizada en el Campo experimental “J. F. Villarino” (Figura 2), que integra la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y el parque “Villarino”. Se encuentra localizada en el municipio de Zavalla a 25km de la ciudad de Rosario y está incluida dentro de la ecorregión de la pampa o de los pastizales pampeanos (FCAgr, 2013). La superficie del predio es de 507,35 hectáreas, en la cual se encuentran las instalaciones de la facultad y el campo experimental (aproximadamente. 350 hectáreas), donde se realizan tareas de docencia, investigación y extensión, y además existen lotes de producción. Las coordenadas geográficas son 33° 01 de latitud Sur y 60° 53 de longitud Oeste.

Dentro de esta zona, se tomaron muestras de distintas especies forrajeras en tres sub-zonas determinadas así:

- **Sub-zona 1. A:** situada en el campo circundante a las canchas de fútbol del parque “J. F. Villarino”, se realizaron colectas de *Paspalum dilatatum*, *Paspalum notatum*. Se colectaron 10 plantas por especie en cada muestreo y se realizaron 4 muestreos en total.
- **Sub-zona 1. B:** pertenece al lote 17 denominado “Módulo de Cría-Invernada”. En esta zona, de 61 hectáreas, se lleva a cabo la cría vacuna de raza Polled Hereford, donde los recursos de alimentación incluyen pastizales naturales, pasturas artificiales consociadas, verdeos invernales y estivales. Dentro de esta zona, se realizaron 2 muestreos, en cada muestreo se colectaron 10 plantas de *Paspalum notatum* y 10 plantas de *Paspalum dilatatum*.
- **Sub-zona 1.C:** pertenece a los Lotes 8, 10, 11 y 12 del módulo Tambo, que presentan una superficie de 14.2, 10.3, 11 y 15 hectáreas, respectivamente. Los recursos de alimentación de cría en estos lotes incluyen pasturas consociadas (alfalfa, festuca y cebadilla), verdeos invernales (cebada, ryegrás, avena), silo de maíz y grano húmedo maíz. Se colectaron 20 plantas de *Lolium multiflorum*, 20 plantas de *Festuca arundinacea* y 20 plantas de *Bromus biebersteinii*. Dentro de cada lote se realizaron 3 muestreos.



Figura 2. Representación esquemática de la ubicación de la zona de muestreo 1 y de las sub-zonas de muestreo descritas, dentro del campo experimental J.F. Villarino (Fuente: <http://www.fcagr.unr.edu.ar>).

Zona 2: Pertenece a la granja orgánica “*Dulces del Jardín*” (Figura 3), con funcionamiento desde el 2005, las coordenadas geográficas son: 32°53'22,8” Sur y 60°50'15,6” Oeste. Se encuentra ubicada en la zona rural al N.O. de la ciudad de Funes, Santa Fe, en un sector de pequeñas chacras. En el mismo se encuentran tres áreas de trabajo:

- 1- Producción primaria de frutas, hortalizas, hierbas aromáticas, medicinales y flores ornamentales.
- 2- Planta de procesamiento y envasado de dulces con certificación orgánica.
- 3- Aprovechamiento del espacio total de la finca y fábrica para experimentación y recorridos educativos.

Dentro de esta granja, se presentan zonas de pastizal naturalizado de baja intervención antrópica que crece de forma espontánea entre los cultivos de hortalizas actuando como barrera natural, donde se colectaron 60 plantas de *Bromus catharticus*.



Figura 3. Granja Orgánica “Dulces del Jardín” en la localidad de Funes- Santa Fe.

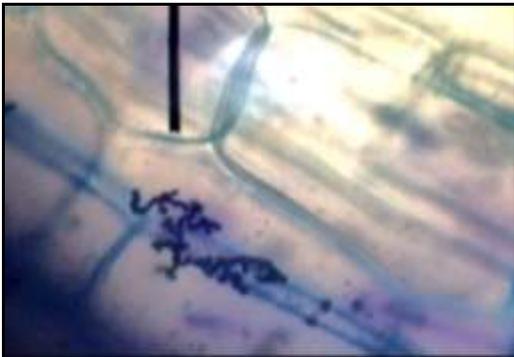
5.2. Detección de hongos endófitos.

Una vez colectadas las plantas fueron procesadas en el laboratorio, eliminando material en descomposición, lavándolas con agua y tomando muestras de hojas, tallos y semillas para revisión microscópica y detección de hongos endófitos.

Se observaron porciones al azar de hojas, tallos y semillas de cada planta. Estas muestras fueron cortadas y teñidas con azul de lactofenol, azul de metileno y azul de metilo y se observaron las muestras en un microscopio a 40x y 100x de aumento. La presencia de hongos endófitos se confirmó por la aparición de micelio fúngico intercelular y de estructuras como hifas (Figura 4), conidias y conidióforos, basándose en la metodología utilizada por Clarck *et al.*, (1983) y Craven *et al.*, (2001).

Para la observación del micelio endófito en semilla, se trató la semilla con NaOH (5% m/v) por 16 horas. Una vez finalizado este proceso, se realizó tinción con azul de algodón siguiendo la metodología de Bacon y White (1994) para la observación de estructuras fúngicas en semillas. Una vez detectada la presencia del hongo en la planta, se realizó el aislamiento del endófito en medio sólido de papa dextrosa agar (PDA).

A.



B.

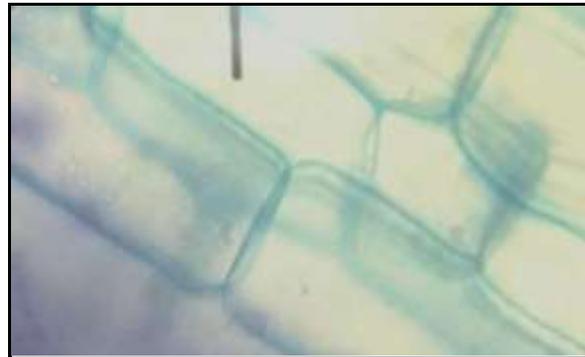


Figura 4. Fotografía microscópica (100x) de epidermis de hoja de *Paspalum dilatatum* con tinción de azul de metileno. A. micelio de hongo endófito, estructuras hifales ubicadas intercelularmente en las paredes celulares vegetales. B. paredes vegetales sin presencia de estructuras hifales fúngicas.

5.3. Aislamiento de hongos endófitos.

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

El proceso de triple esterilización utilizado fue:

Alcohol (90% v/v) 1 minuto → Hipoclorito de sodio (50% m/v) 9 minutos → Alcohol (70% v/v) 1 min → 3 enjuagues con agua destilada → secado con papel filtro estéril.

Se realizaron cortes de 3-5 milímetros de las muestras esterilizadas y se sembraron de 6 a 8 porciones de hojas y tallos en cajas de Petri de 9 centímetros de diámetro con medio PDA (Figura 5); a cada caja de Petri se le aplicó 3 gotas de ácido láctico con el fin de controlar crecimiento bacteriano. Para la siembra de semillas en medio PDA, éstas se ablandaron dejándolas durante 8 horas en una solución de hidróxido de sodio y se siguió el protocolo de Bacon y White para aislamiento de endófitos en semillas (Bacon y White, 1994). Todo el material fue incubado a 28 °C en oscuridad por 20 días para esporulación y en cámara de luz artificial a 27°C por 15 días mantenimiento de especies con crecimiento lento.

Se controlaron los cultivos regularmente para eliminar hongos oportunistas que aparecen mucho antes que los hongos endófitos. La obtención de cultivos puros, se realizó siguiendo el protocolo de cultivos monosporicos de Cañedo y Ames, (2004), tomando una pequeña porción del hongo y realizando una dilución de Tween al 0.1%, en un tubo eppendorf, sometido a agitación manual o en vórtex dependiendo del tipo de hongo, para la separación de esporas, una vez realizado este proceso, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en caja de Petri 100 µl de la dilución que presentaba una concentración de 50 a 100 esporas por milímetro, en el conteo con la cámara de Neubauer, los cultivos fueron revisados cada 24 hrs a partir de la siembra y se transfirieron a nuevas cajas de Petri las colonias separadas, tomando con la punta de una aguja una sola conidia. El mantenimiento de los hongos se realizó mediante nuevas inoculaciones cada tres meses y conservando todo el material ya crecido en heladera a 4°C. Todos los procesos de siembra e inoculación de las muestras fueron realizados en cámara de flujo laminar.

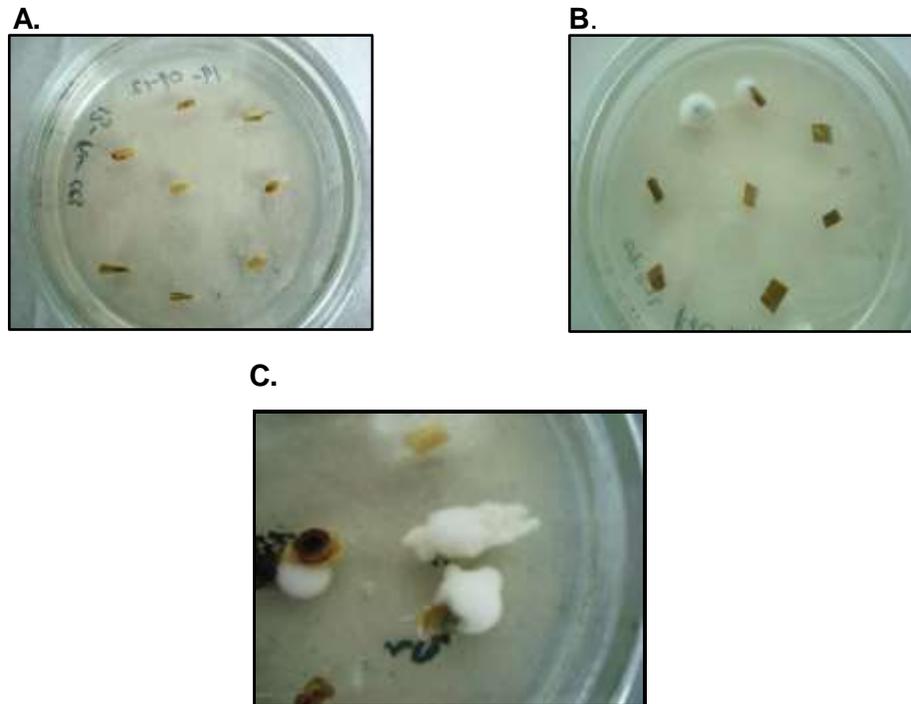


Figura 5. Aislamiento de hongos endófitos a partir de cortes de tallo y hoja. A. Siembra de cortes de tallo y hoja de especies forrajeras en medio PDA; B. 2 colonias de hongos endófitos creciendo partir de corte de hoja sembrado en medio PDA (10 días de cultivo). C. colonias de hongo endófito a partir de corte de tallos en medio PDA (15 días de cultivo).

5.4. Identificación taxonómica de endófitos fúngicos.

Una vez obtenido el cultivo puro de las cepas, se procedió a identificar taxonómicamente los hongos. Se registraron datos morfológicos macro y microscópicos de las cepas endófitas. La observación microscópica de las estructuras fúngicas se realizó por medio de un microscopio óptico Zeiss KS KF2® con aumento a 10, 40 y 100x, realizando tinción de azul de lactofenol y azul de metileno usando la técnica de la cinta transparente adhesiva (Arenas, 1993). Brevemente, se presiona la cinta adhesiva contra la colonia fúngica utilizando el lado adhesivo y se pega a un portaobjetos con una gota de colorante. También se realizó observación microscópica de la distribución de las estructuras fúngicas por la observación en un microcultivo. Esta técnica se realiza depositando un cubo del medio PDA estéril sobre un portaobjetos, en el que se siembra el hongo por sus bordes apoyado sobre dos varillas de vidrio, dentro de una caja de Petri en cuyo fondo

hay un papel absorbente estéril embebido en agua (Figura 6). Los hongos fueron incubados durante una semana a 28°C en oscuridad.

Se registró la forma y tamaño de esporas, hifas, esporangios, presencia y/o ausencia de septos, entre otras estructuras de hongos filamentosos. Los hongos aislados se identificaron siguiendo claves taxonómicas (Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980; Von, 1981; Bacon y White, 1994; Redlin y Carris, 1996; Barnett y Hunter, 1998; Ulloa y Hanlin, 2000; Samson *et al.*, 2005), y páginas web con claves electrónicas como: y Mycobank (2012), bugs.bio (2013), Mc Darvy (2013) y CBS (2014). La ocurrencia de un hongo se tomó como positiva cuando fue detectado y/o aislado en al menos una muestra o segmento de órgano en la planta.

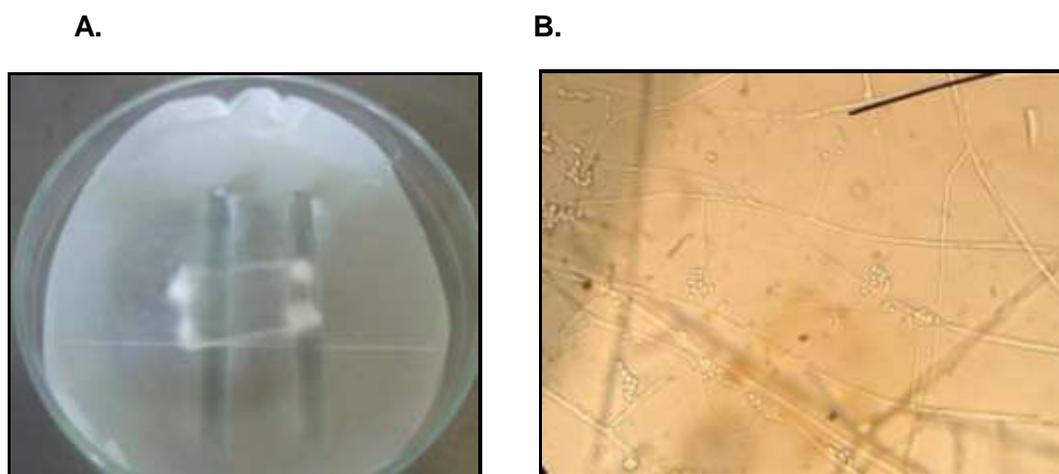


Figura 6. Técnica de microcultivo para la observación de la disposición de las estructuras fúngicas microscópicas. A. microcultivo en caja de Petri de endófito fúngico 8 días de incubación a 28°C. B. observación de estructuras microscópicas fúngicas a 40x de aumento.

5.5. Prueba de antagonismo- cultivo doble.

Consiste en el desarrollo simultáneo del microorganismo patógeno y del potencial antagonista, en medio PDA y permite evaluar las interacciones entre hongo endófito y hongo patógeno (Fokkema, 1978). Para esta prueba, se realizó la *técnica de enfrentamiento dual* entre endófitos y aislamientos de hongos patógenos obtenidos de las mismas especies forrajeras que presentaban signos de infección (Živković *et al.*, 2010). Dos cepas, una patógena y otra endófito no patógena, se sembraron una frente a la otra en una misma caja de Petri, a la máxima distancia entre sí y a 2 cm del borde de la caja (Figura 7); se realizaron 3 réplicas de cada cultivo doble. Se llevó registro fotográfico y

medición del diámetro de cada colonia a los 7 y 15 días de inoculación, así como la presencia o ausencia de halo inhibitorio. El porcentaje de inhibición y antagonismo (PGI, sigla derivada del inglés Percentage Growth Inhibition), se calculó por la fórmula de Skidmore y Dickinson, (1976):

$PGI (\%) = KR - R1 / KR \times 100$, donde;

KR: radio del patógeno desde el centro del punto de inoculación hacia el borde de la colonia en el cultivo de control (sin enfrentamiento con antagonista).

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

Los porcentajes de inhibición (PGI) fueron categorizados de acuerdo con categoría de inhibición de crecimiento (CIC) de Živković *et al.*, (2010), donde, 0= no inhibición del crecimiento del patógeno; 1= 1-25% de inhibición de crecimiento del patógeno; 2= 26-50% de inhibición del crecimiento del patógeno; 3= 51- 75% y 4= 76- 100% de inhibición del crecimiento del patógeno. Se registró la zona de inhibición en los cultivos dobles como la distancia en milímetros entre el hongo patógeno y el hongo antagonista después de 7 días de crecimiento. Estas zonas fueron categorizadas así:

- no hay zona de inhibición; + (muy débil): 0-5 mm; ++ (débil): 6-10 mm; +++ (moderada): 11-15 mm; ++++ (fuerte): 16-20 mm; +++++ (muy fuerte): > 2 cm.

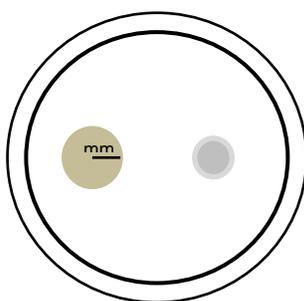


Figura 7. Esquema representativo de un cultivo doble en una caja de Petri donde dos colonias, una patógena y otra antagonista, son enfrentadas. Los círculos pequeños representan colonias fúngicas.

5.6. Selección de patógenos para cultivos dobles.

Se seleccionaron cepas patógenas provenientes de plantas enfermas de las especies gramíneas colectadas que fueron aisladas en medio de cultivo PDA. Para los enfrentamientos en cultivos dobles se usaron patógenos de 8 días de crecimiento desde la siembra del inóculo.

Las cepas patógenas seleccionadas fueron: *Alternaria alternata* (Fr.) keissl (cepa 046), *Alternaria* sp.1, (cepa 035), *Curvularia clavata* (B.L). Jain (cepa 048), *Curvularia pallescens* Boedijn (cepa 044) y *Fusarium* sp.1, (cepa 049).

5.6.1. Antagonistas usados.

Seis cepas endófitas pertenecientes al género *Acremonium*, aisladas en medio PDA de plantas sin síntomas de enfermedad fueron usadas para cultivos dobles contra las cepas patógenas seleccionadas. Para tal fin se utilizaron cepas de cultivos puros de 15 días de crecimiento desde la siembra del inóculo. Las cepas de *Acremonium* spp. seleccionadas como antagonistas fueron:

Acremonium sp.3 (cepa 033), *Acremonium* sp.4 (cepa 040), *Acremonium* sp.7 (cepa 050), *Acremonium* sp.2 *aff kiliense* Grütz (cepa 064), *Acremonium strictum* W. Gams (cepa 052) y *Acremonium* sp.6 (cepa 073).

5.7. Preparación de extractos fúngicos para la obtención de metabolitos secundarios.

Una vez aislados y purificados los hongos endófitos, se inocularon en medio de cultivo líquido enriquecido. Los medios líquidos usados para este fin fueron: medio M102 (medio a base de sacarosa) (Anexo 1) para la esporulación y crecimiento del micelio y medio SM (medio a base sorbitol) usado para estimular la producción de metabolitos bioactivos, siguiendo la metodología para cultivo líquido de endófitos de Bacon, (1985) (Anexo 1). El medio M102 inoculado con el hongo endófito fue sometido a agitación durante 10 días por medio de un agitador orbital MRC®, a una temperatura de 30°C y con agitación de 100 a 150 revoluciones por minuto (rpm) (Figura 8). El micelio obtenido del cultivo, se filtró con gasa estéril, se secó a 50°C y se guardó en freezer a -80°C (Thermo Scientific ULT®). A partir del cultivo en medio líquido M102, se tomó 1 ml y se inoculó el medio líquido SM el

cual fue sometido a agitación orbital en las mismas condiciones descritas arriba. Los cultivos obtenidos en ambos medios líquidos, se centrifugaron a 10.000 rpm y 8°C durante 15 minutos. El material obtenido (micelio fúngico y sobrenadante) se conservó en freezer a -20°C, y las réplicas a -80°C. Veintitres cepas de hongos endófitos fueron usadas para la obtención de extractos fúngicos en medio líquido.



Figura 8. Cultivos líquidos (medios M102 y SM) con agitación orbital para la estimulación de la producción de micelio y metabolitos secundarios por parte del hongo endófito.

5.8. Extracción de metabolitos bioactivos.

Para la extracción de metabolitos fúngicos se realizaron dos procesos diferentes a fin de optimizar el método de extracción que resultara más eficiente. También se realizaron comparaciones entre los metabolitos extraídos a partir de cultivos puros en medios líquidos y metabolitos extraídos a partir de micelio con exudado en cultivos antagónicos, utilizados posteriormente en pruebas de actividad antimicrobiana.

Las cepas a las que se les realizó la extracción de metabolitos fúngicos fueron:

1. *Acremonium strictum* (039): a partir de cultivo líquido en medio SM.
2. *Acremonium* sp.4 (040): a partir de cultivo líquido en medio SM.
3. *Acremonium* sp.4 (040) (Ex): a partir de micelio que presentó exudado en cultivo en antagónico con la cepa 031 en medio PDA.
4. *Acremonium* sp.4 (040) (AC): a partir de micelio de cultivo puro en medio PDA y extraído con solvente acetonitrilo.
5. *Acremonium* sp.5 (058): a partir de cultivo líquido en medio SM.
6. *Aspergillus* sp.1 (021)*: a partir de cultivo líquido en medio SM.

7. *Aspergillus niger* (024)*: a partir de micelio crudo puro.

8. *Fusarium* sp.2 (059)*: a partir de cultivo líquido en medio SM.

*estas cepas fueron usadas a modo de control para verificar los procesos de extracción según bibliografía (Senyuva y Gilbert, 2007; Blumenthal, 2003) y confirmar la producción de metabolitos de especies fúngicas reconocidas por ser productoras de metabolitos como lo son las cepas del género *Aspergillus* (Blumenthal, 2003).

5.8.1. Extracción de metabolitos fúngicos a partir de cultivos en medio líquido SM.

Los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos en medio líquido SM se sometieron a extracción con solventes orgánicos, usando como solvente acetato de etilo (AcOEt). Cada cultivo a extraer fue colocado en un tubo de centrifuga y se agregó AcOEt a la solución, se tapó el tubo, se agitó y se centrifugó para favorecer la total separación de fases. Una vez realizado este proceso, se dejó reposar y se separó la fase orgánica colocándola en un balón. A dicha fase, que contiene los metabolitos extraídos, se la secó por agregado de sulfato de sodio; se filtró a través de algodón con un embudo y se evaporó en rotavapor (Heidolph Instruments®).

5.8.2. Extracción de metabolitos fúngicos a partir de micelio crudo.

Las cepas *Acremonium* sp4. (040) y *A. niger* (024) fueron inoculadas para la obtención de cultivos puros de cada una en medio PDA en incubadora a 28°C y oscuridad por 8 y 14 días, para posteriormente tomar porciones de micelio con agar y realizar extracción con solventes orgánicos. Se usó la cepa *A. niger* como control para la estandarización del proceso según metodología de Senyuva y Gilbert, (2007).

5.8.2.1. Extracción de metabolitos fúngicos de las cepa endófito *Acremonium* sp.4 (040) AC y *Aspergillus niger* (024) en cultivo puro en medio PDA.

A fin de establecer diferencias entre los metabolitos fúngicos producidos por la cepa *Acremonium* sp. en cultivo puro y en cultivo antagónico y analizar su actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas fúngicas, se realizó la extracción de metabolitos a partir de micelio crudo obtenido del cultivo puro de la cepa con 14 días de antigüedad en medio PDA. Se tomaron porciones de micelio + medio PDA de 6 mm de diámetro, las porciones de micelio fueron transferidas a frascos de vidrio donde se realizó extracción doble con 2 ml de AcOEt con 1% de ácido fórmico y seguidamente 2 ml de acetonitrilo.

Una vez realizado este proceso, la muestra se llevó a vórtex durante 1 minuto y homogeneizó por sonicación durante 30 minutos, este proceso también se realizó de igual forma para la cepa control *A. niger* (024) basándose en la metodología empleada por Senyuva y Gilbert, (2007). Los extractos fueron filtrados y evaporados bajo corriente de nitrógeno y los residuos fueron disueltos en 1 ml de metanol.

5.8.2.2. Extracción de metabolitos fúngicos de la cepa antagonista *Acremonium* sp.4 (040) (Ex) en el cultivo dual contra la cepa *Alternaria* sp.1 (031).

Se cortaron 3 secciones de micelio de la cepa *Acremonium* sp4. (040) que contenían gotas en su superficie como exudado. Los mismos fueron introducidos a un frasco de vidrio con 5 ml de AcOEt, se agitó y posteriormente la muestra fue sometida a sonicación por 20 minutos a 8°C. Finalizado este proceso, la muestra fue filtrada, el solvente fue removido por evaporación al vacío en el rotavapor y el extracto crudo fue diluido en metanol llevándolo a una concentración de 5 mg/ml.

Los extractos fueron analizados por cromatografía en capa delgada y una prueba piloto de espectrometría de masa a fin de estandarizar protocolos de extracción y cromatográficos.

5.9. Cromatografía en capa delgada (Thin Layer Chromatography (TLC)) de los extractos fúngicos.

Los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos en medio líquidos se sometieron a extracción con solventes orgánicos, usando como solvente AcOEt. Cada medio líquido a extraer fue colocado en un balón y se agregó AcOEt a la solución, se tapó el balón y se agitó. Una vez realizado este proceso, se dejó reposar y se separó la fase orgánica y la fase acuosa en diferentes erlenmeyers. A la fase acuosa, que contiene el metabolito extraído, se le agregó sulfato de sodio como deshidratante; la solución se filtró con un embudo y tapón de algodón y se evaporó en un rotaevaporador (Heidolph Instruments ®). La muestra evaporada fue recuperada agregando AcOEt y se colocó en un frasco de vidrio pequeño color ámbar, previamente pesado para determinar el volumen del extracto obtenido por diferencia de peso. Las muestras que presentaron problemas para la separación de la fase orgánica y acuosa en el balón fueron centrifugadas a 8000rpm

durante 5 minutos a fin de obtener una mejor separación de ambas fases para la extracción del los compuesto de cada cultivo líquido.

Se realizó cromatografía en placa delgada (TLC) usando como solvente de corrida (eluyente) hexano- acetato (1:1) y para muestras muy polares se usó diclorometano-metanol (15:1). La corrida cromatográfica se realizó en una placa cromatográfica de 7 centímetros de largo con silica gel como absorbente, en un vaso de vidrio con tapa de vidrio de reloj a modo de cámara cromatografica, se sembró cada extracto obtenido con un capilar (6 aplicaciones) en la placa cromatografica y se utilizó brucina como patrón alcaloide y testigo del revelado. Se dejó correr la placa hasta 1 cm antes del borde superior y se retiró. Se observaron y marcaron las manchas de la corrida bajo luz UV y se reveló la placa cromatográfica sumergiéndola en una solución de yodoplatinato, con el fin de revelar posibles manchas no vistas bajo luz UV. Se cuantificó la migración de los extractos calculando el factor de retención (R_f) de cada compuesto, que se determina como distancia recorrida por el compuesto (x_c) / distancia recorrida por el eluyente (x_e).

5.10. Análisis de los extractos mediante espectrometría de masa (ESI-QToF).

Los extractos fúngicos fueron analizados por espectrometría de masa usando ionización por electrospray. El análisis de masas fue realizado con el espectrómetro de masa Bruker MicrOTOF-Q II™. El análisis de los metabolitos fúngicos se realizó por infusión directa, con fuente de ionización por electrospray, el instrumento fue escaneado de m/z 50 a 1500 para todas las muestras tanto en modo positivo como en modo negativo. Las soluciones stock de extracto fueron diluidas en acetonitrilo o metanol hasta una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$ agregando agregando acetato de amonio hasta una concentración final de 2,5 mM.

Los espectros de cada extracto fueron analizados con el programa DataAnalysis de Bruker Compass™ y con programas de versión libre online como Massbank.jp (Massbank, 2013) para la predicción de compuestos y formulas químicas. Los procedimientos de extracción, CCD y análisis de los metabolitos secundarios por ESI-QToF fueron realizados en el Instituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

5.11. Pruebas de actividad antimicrobiana con los extractos fúngicos obtenidos.

Los compuestos fúngicos evaporados que se obtuvieron mediante la extracción con solventes orgánicos, fueron enfrentados con las especies fúngicas patógenas empleadas en los enfrentamientos duales y con otras cepas patógenas no probadas en enfrentamiento dual. Para ello se siguió la *técnica de excavación-placa cultivo*. Se sembraron en cajas de Petri aislamientos de hongos patógenos y una vez que el hongo se estableció y comenzó su crecimiento en el medio PDA, se realizaron 7 huecos por caja de Petri con un sacabocados de 5 milímetros (Figura 9). Dentro de cada hueco, se colocaron 20 µl del extracto diluido en 1 ml de dimetil-sulfóxido (DMSO) al 0.1 % (v/v). Se probaron 7 extractos por caja de Petri y se hicieron 2 réplicas por ensayo. Se realizó seguimiento a los cultivos observando si la colonia detenía su crecimiento en algún lado cercano a los extractos así como la presencia o ausencia del halo de inhibición formado alrededor de cada hueco, siendo la presencia del halo una señal de la propiedad antibiótica o anti-fúngica del extracto (Okeke *et al.*, 1994). Se preparó una solución stock de cada extracto en DMSO, para lo cual se pesaron 20 mg de extracto y se le agregó 1 ml de DMSO. A partir de esta solución se tomaron 200 µl para hacer diluciones seriadas en 1 ml de DMSO hasta lograr una concentración (50:50). Finalizados los procesos realizados en el laboratorio (Figura 10), se procedió al análisis cualitativo y cuantitativo de los datos obtenidos.

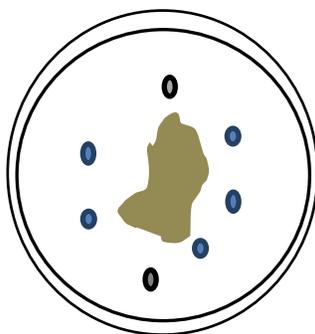


Figura 9. Esquema representativo de la técnica excavación- placa cultivo. Los círculos pequeños representan los huecos formados en el medio PDA que contienen extractos fúngicos a probar contra la colonia patógena (en gris).

Se eligió DMSO como diluyente de los extractos ya que este compuesto no influye en el crecimiento de los hongos (Chaparro, 2010), con lo cual se evitó la obtención de falsos positivos. Por este motivo, se lo empleó también como control negativo.

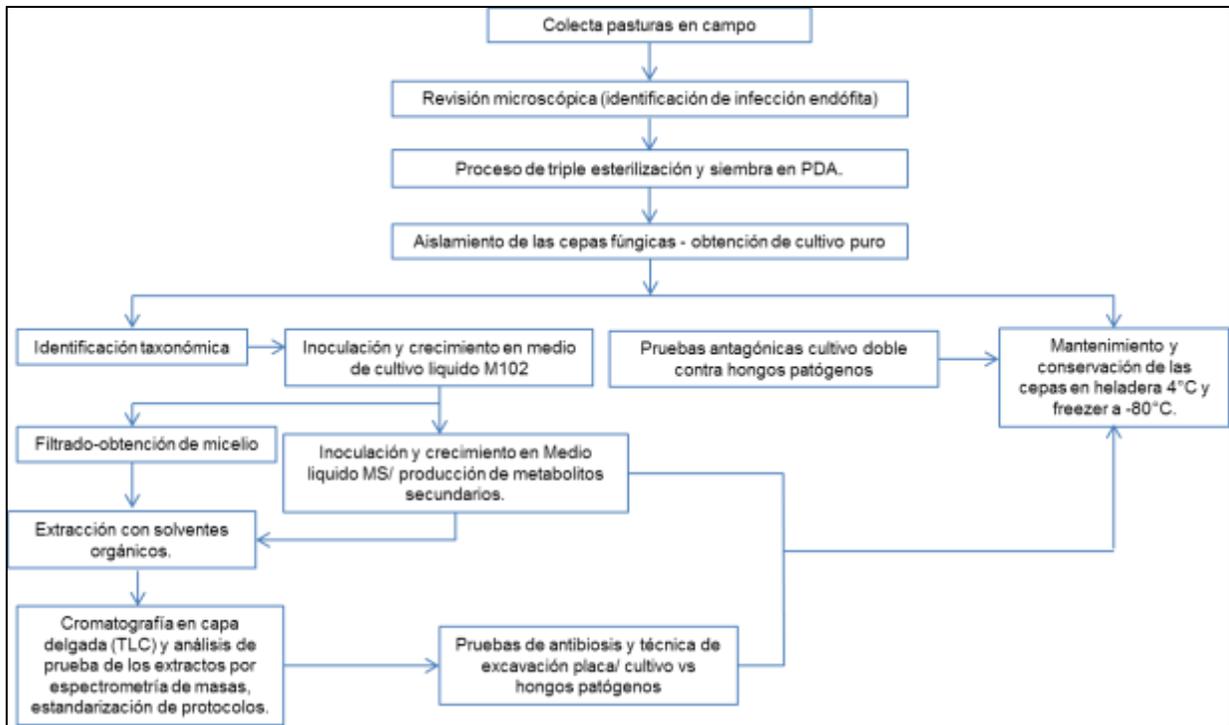


Figura 10. Esquema general de los procesos realizados en el proyecto.

5.11. Análisis de Datos.

Se registró el número de especies y cepas de hongos endófitos aislados de las gramíneas por zona de muestreo y se calcularon los parámetros básicos como el porcentaje de infección endófitas por zona de muestreo y especie vegetal, fecha de colecta, número de etiqueta, nombre científico, número de réplicas y siembras *in vitro*. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PGI) de los hongos patógenos probados, fue calculado y sometido a un análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías, usando los valores de PGI transformados por la raíz cuadrada del arco-seno. La prueba de normalidad se realizó con el test de Shapiro-Wilks. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat/L, versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

6. RESULTADOS

6.1. Especies fúngicas aisladas de las gramíneas estudiadas.

Los principales taxa aislados de las especies gramíneas asintomáticas colectadas, pertenecen a los géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Sthempphyllium*. Respecto al aislamiento de hongos endófitos en las especies de gramíneas estudiadas, se encontró un mayor número de cepas endófitas asociadas a la especie *Bromus catharticus*. No se obtuvieron aislamientos de cepas fúngicas a partir de tallos, semillas y hojas de plantas colectadas de las especies *Lolium multiflorum* y *Festuca arundinacea* a lo largo del tiempo de muestreo. Varias cepas de hongos fueron aisladas en ambos lugares de muestreo, como la especie *Acremonium strictum* y cepas de *Acremonium* sp.1, sp.4, sp.5, y sp.6, *Aspergillus* sp.1, *Fusarium* sp.2, y *Pencillium* sp.4. Dentro de las especies gramíneas de las cuales se aislaron hongos endófitos, la especie *P. notatum* presentó el menor número de aislamientos (Figura 11). (Las descripciones morfológicas de cada uno de los aislamientos endófitos fúngicos obtenidos esta en anexo 2).

Con respecto a las cepas patógenas aisladas, dentro del género *Alternaria*, la especie *Alternaria alternata* fue aislada solamente en *P. dilatatum*, mientras que las demás cepas de *Alternaria* fueron todas aisladas de *B. catharticus* de la zona de muestreo 2. Respecto al género *Curvularia*, las cepas fueron aisladas de las especies hospedantes *Paspalum dilatatum* y *B. biebersteinii* en la zona 1. La especie *Fusarium* sp.2, se aisló a partir de *B. catharticus*, *B. biebersteinii* y *P. dilatatum*, encontrándose en ambas zonas de muestreo, mientras que la especie *Fusarium* sp.1, sólo se aisló de *B. catharticus* (Tabla 1). Las cepas aisladas de los géneros de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Sthempphyllium*, no se consideraron como especies patógenas ya que todos los aislamientos fueron realizados a partir de plantas sanas sin síntomas de enfermedad al igual que las cepas del género *Acremonium* (Tabla 1).

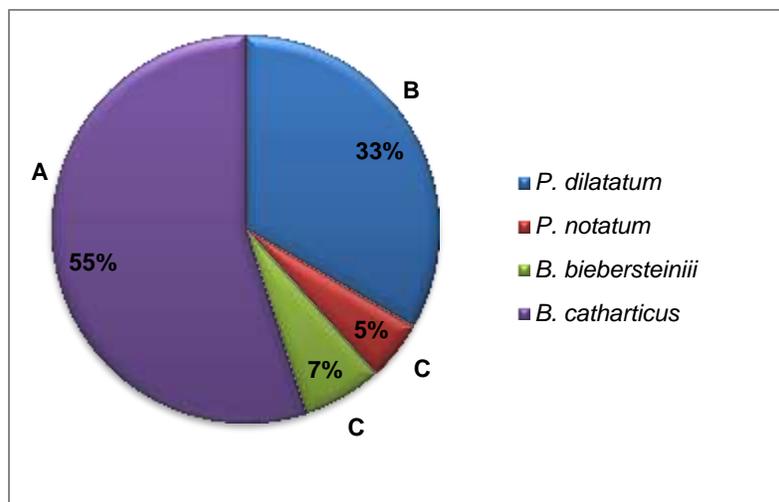


Figura 11. Porcentaje de plantas con hongos endófitos. Diferentes letras indican diferencias significativas $F = 33.86$, $gl = 3$, $p < .0001$

Tabla 1. Especies de hongos endófitos y patógenos aislados de las especies de gramíneas muestreadas en cada zona.

Especie Endófitas aislada ¹	ZONA 1A y 1B ²	ZONA 2 ²	Especie vegetal hospedante	Estado de las plantas colectadas ³
<i>Acremonium strictum</i> (039 y 052)	x	x	<i>Paspalum notatum</i> y <i>Bromus catharticus</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.1 (030, 032 y 057)	x	x	<i>P. notatum</i> , <i>Bromus biebersteinii</i> y <i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.2 aff. <i>Kiliense</i> (064)	x		<i>Paspalum dilatatum</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.3 (033)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.4 (040 y 051)	x	x	<i>P. dilatatum</i> y <i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.5 (053, 056 y 058)	x	x	<i>B. biebersteinii</i> y <i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.6 (054, 072 y 073)	x	x	<i>P. dilatatum</i> y <i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Acremonium</i> sp.7 (074, 050 y 055)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Alternaria alternata</i> (046)	x		<i>P. dilatatum</i>	Enferma
<i>Alternaria raphani</i> (001)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Alternaria brassicola</i> (010 y 019)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Alternaria</i> sp.1 (013, 014, 031 y 035)		x	<i>B. catharticus</i>	Enferma
<i>Alternaria</i> sp.2 aff. <i>cheiranthi</i> (018)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Alternaria</i> sp.3 (027 y 067)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática

<i>Aspergillus niger</i> (024 y 063)	x		<i>P. dilatatum</i> y <i>B. biebersteinii</i>	Enferma
<i>Aspergillus</i> sp.1 (015, 021 y 061)	x	x	<i>P. dilatatum</i> y <i>B. catharticus</i>	Enferma
<i>Aspergillus</i> sp.2 <i>aff. flavus</i> (060)	x		<i>P. notatum</i>	Asintomática
<i>Aspergillus</i> sp.3 (070)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Curvularia</i> sp.1 (029 y 034)	x		<i>P. dilatatum</i> y <i>B. biebersteinii</i>	Asintomática
<i>Curvularia pallescens</i> (037, 041 y 044)	x		<i>P. dilatatum</i>	Enferma
<i>Curvularia</i> sp.2 <i>aff. eragrostidis</i> (042)	x		<i>P. dilatatum</i>	Asintomática
<i>Curvularia clavata</i> (048)	x		<i>P. dilatatum</i>	Enferma
<i>Fusarium</i> sp.1 (043 y 049)		x	<i>B. catharticus</i>	Enferma
<i>Fusarium</i> sp.2 (023, 059 y 062)	x	x	<i>P. dilatatum</i> , <i>B. biebersteinii</i> y <i>B. catharticus</i>	Enferma
<i>Penicillium</i> sp.1 (002)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Penicillium</i> sp.2 (003 y 065)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Penicillium</i> sp.3 (005 y 007)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Penicillium</i> sp.4 (008, 011, 016, 068 y 069)	x	x	<i>P. dilatatum</i> y <i>B. catharticus</i>	Asintomática
<i>Stemphylium</i> sp.1 (012 y 028)	x		<i>P. dilatatum</i> y <i>P. notatum</i>	Asintomática
No identificado (004)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
No identificado (006)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
No identificado (017)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
No identificado (020)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
No identificado (025)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
No identificado (026)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática
No identificado (036)		x	<i>P. dilatatum</i>	Asintomática
No identificado (038)	x		<i>P. dilatatum</i>	Enferma
No identificado (045)	x		<i>P. dilatatum</i>	Asintomática
No identificado (047)	x		<i>P. dilatatum</i>	Asintomática
No identificado (066)	x		<i>P. dilatatum</i>	Asintomática
No identificado (071)		x	<i>B. catharticus</i>	Asintomática

¹Los números entre paréntesis representan el código de la cepa aislada. ²Las "x" representan la zona de muestreo de donde fue colectada la especie vegetal. ³Se indica el estado de la planta colectada de la cual fue aislada la especie fúngica, en donde, *asintomática* se refiere a plantas colectadas sin síntomas visibles de enfermedad y *enferma* se refiere a las plantas con síntomas de enfermedad (marchitamiento, necrosis) colectadas para obtención de posibles hongos patógenos usados en pruebas de enfrentamiento.

El género endófito *Acremonium* fue aislado en cuatro especies vegetales: *B. catharticus*, *B. biebersteinii*, *P. dilatatum* y *P. notatum*. La especie gramínea *B. catharticus* presentó el mayor porcentaje de infección endófito del género *Acremonium* y las especies gramíneas *B. biebersteinii* y *P. notatum* mostraron el porcentaje mas bajo de infección endófito del género *Acremonium* (Figura 12).

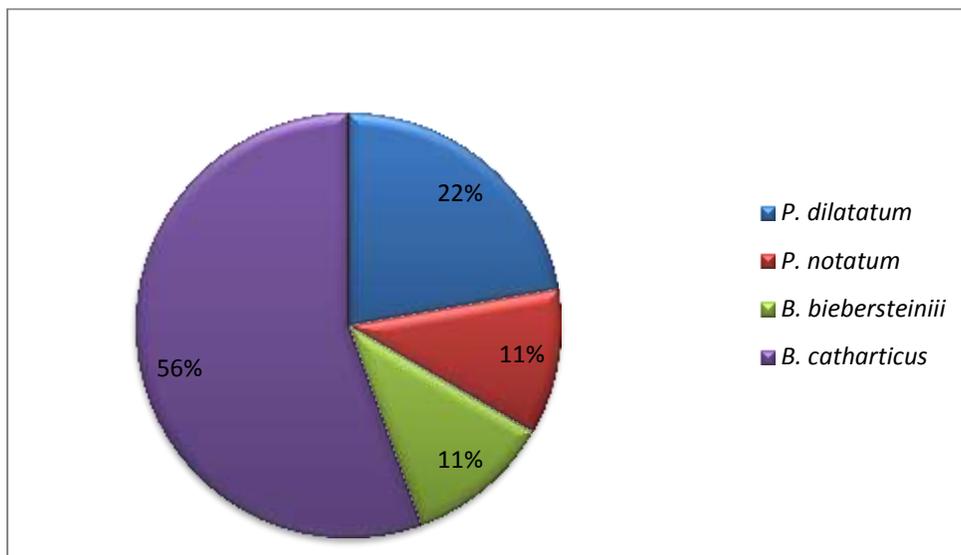


Figura 12. Porcentaje de aislamientos de especies del género *Acremonium* según especie vegetal colectada.

En cuanto al número de cepas fúngicas aisladas en cada zona de muestreo, *Acremonium* presenta un mayor número de aislamientos en la zona de muestreo 2, al igual que los géneros *Alternaria* y *Penicillium*, mientras que el género *Aspergillus* presentó un mayor número de cepas aisladas en la zona de muestreo 1 y los géneros *Curvularia* y *Sthemphylium* fueron solamente aislados en la zona de muestreo 1 (Figura 13) y en general el género *Acremonium* obtuvo el mayor número de aislamientos (Figura 14).

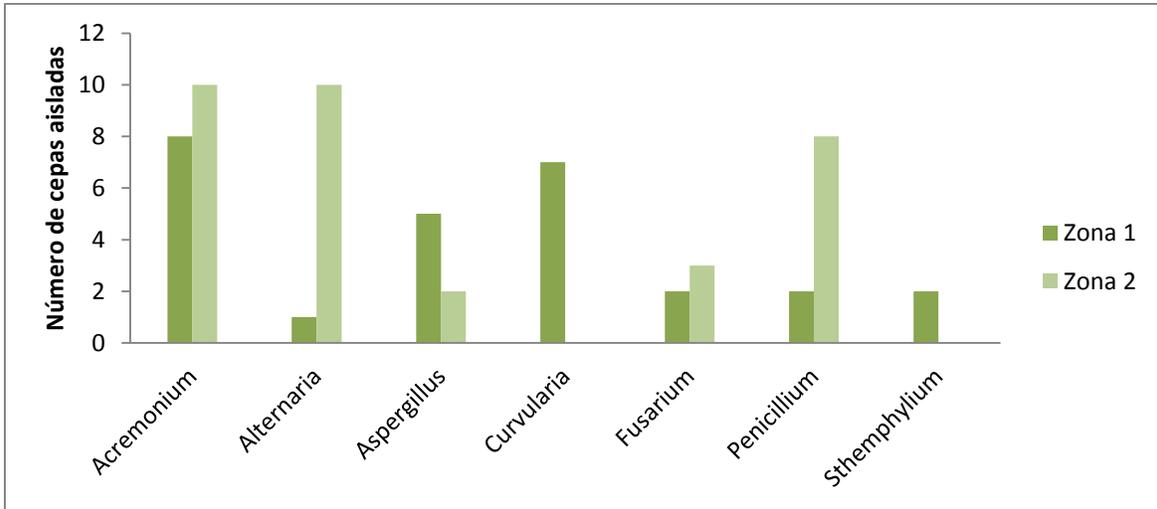


Figura 13. Cepas aisladas por género en las zonas de muestreo

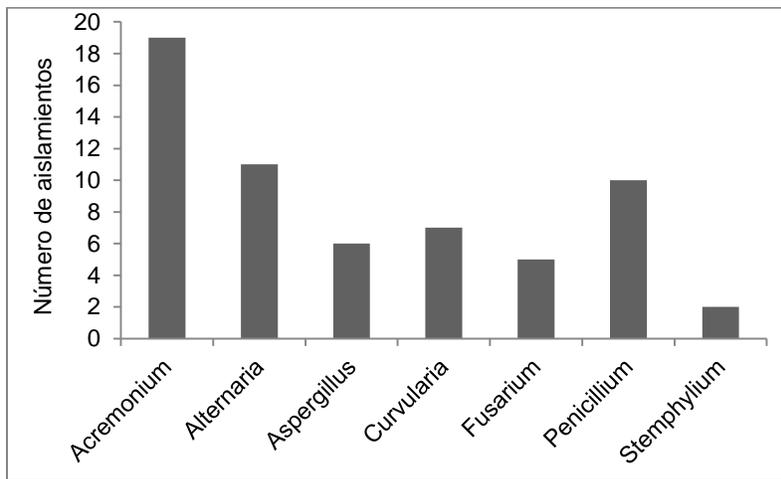


Figura 14. Frecuencia de los principales géneros fúngicos aislados, la figura resume los valores de todas las especies gramíneas evaluadas.

Doce cepas endófitas no fueron identificadas por el análisis de las características morfológicas mediante el uso de claves taxonómicas. Estas cepas no fueron incluidas en los análisis de la composición endófito por zona de muestreo junto con las cepas identificadas. Respecto a la distribución de estas cepas no identificadas, 5 cepas fueron aisladas de la especie *P. dilatatum* en la zona de muestreo 1 y 7 cepas fueron aisladas de la especie *B. catharticus* en la zona de muestreo 2.

En la especie vegetal *B. catharticus* se obtuvo el mayor número de aislamientos para los géneros fúngicos: *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium* mientras que en la

especie *P. dilatatum*, se obtuvo el mayor número de aislamientos para los géneros fúngicos: *Aspergillus* y *Curvularia* (Figura 15).

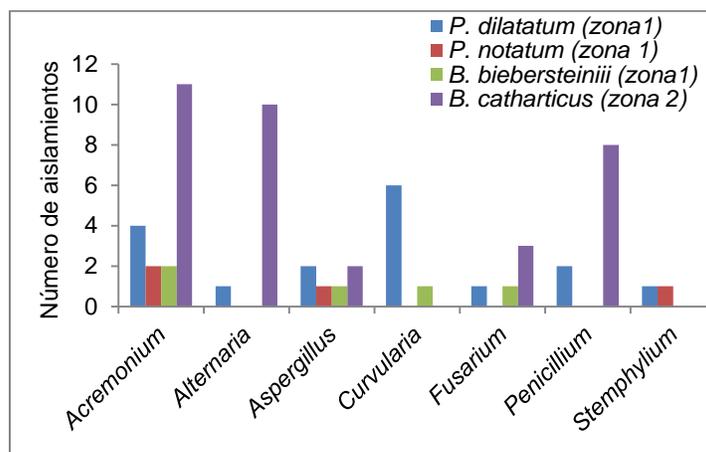


Figura 15. Principales géneros fúngicos aislados por especie vegetal.

6.3. Pruebas de actividad antagónica *in vitro*.

Las cepas endófitas aisladas del género *Acremonium* mostraron diferente actividad antagónica frente a las cepas potencialmente patógenas probadas (Figuras 16 y 17). *Acremonium* sp.3 (033) presentó la mayor actividad antagónica frente a *Alternaria alternata* y a *Alternaria* sp., respectivamente. Estos fueron los valores más altos en la categoría de inhibición de crecimiento (CIC) de 4 (Tabla 2). Las cepas *Acremonium* sp.4 (040) y *A. strictum* (052), también presentaron el mismo valor de CIC de 4 para *A. alternata*, mientras que las cepas *Acremonium* sp.7 (050) y *Acremonium* sp.2 aff. *kiliense* (064) mostraron el porcentaje de inhibición más bajo con un CIC de 2. El efecto antagónico de *Acremonium* sp.2 aff. *kiliense* (064) sobre *Alternaria* sp representó el valor más bajo de los porcentajes (CIC de 1).

Para la especie patógena *Curvularia clavata*, el mayor efecto antagónico se obtuvo en el cultivo dual frente a *Acremonium* sp.7 (050). En los demás enfrentamientos duales de *C. clavata*, el porcentaje de inhibición fue similar y se ubicó a las demás cepas patógenas dentro de una misma CIC de 2 (bajo). Para *C. pallenscens*, el mayor porcentaje de inhibición se evidenció en el cultivo dual frente a *Acremonium* sp.7 (050 seguido por los valores de PGI de las cepas de *Acremonium* sp.3 (033) y *Acremonium* sp.6 (073), que presentaron el mismo valor de inhibición. En el enfrentamiento dual con la especie

Acremonium sp.2 *aff killiense* se evidenció el menor porcentaje de inhibición. En el enfrentamiento dual de la especie patógena *Fusarium* sp.1 (049) frente a las cepas antagonistas se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición con la cepa *Acremonium* sp.2 *aff killiense* (064). En términos generales, la cepa antagonista *Acremonium* sp.2 *aff killiense* (064) presentó los valores más bajos de inhibición frente a las especies patógenas probadas. Por otro lado, la cepa antagonista *Acremonium* sp.3 (033) exhibió los valores más altos de inhibición.

La prueba de Shapiro-Wilks confirmó la distribución normal de las observaciones ($p=0,45$), aceptando la hipótesis nula de que todas las observaciones tienen una distribución normal bajo el supuesto $p > 0.05$. El resultado del análisis de varianza confirma que existen diferencias altamente significativas ($p < .0001$) entre los distintos grados de antagonismo que presentaron las cepas estudiadas frente a las cepas patógenas. Del mismo modo, este análisis indicó que existe interacción entre los efectos de las cepas patógenas y de las antagonistas.

En cuanto a las zonas de inhibición observadas en los cultivos antagonistas, el cultivo de *Acremonium* sp.4 (040) vs *Alternaria alternata* (046) presentó una zona de inhibición fuerte (15-18 mm). Igualmente, la zona de inhibición fue fuerte (17-20 mm) en los cultivos dobles de esta cepa antagonista vs. *Alternaria* sp.1 (035) (Figura 17A). Se observaron zonas de inhibición de moderada a débil en los cultivos dobles contra la cepa patógena *Curvularia pallescens* (044) y en el cultivo doble con la cepa *Acremonium* sp.7 (050) (Figura 17E). En este caso, no hubo presencia de halo inhibitorio o zona de inhibición. En los cultivos dobles con la especie patógena *Fusarium* sp.1 (049) no se observó una zona de inhibición con ninguna de las cepas candidatas a comportarse como antagonistas probadas, al cabo de 14 días de incubación (Tabla 2). En el enfrentamiento dual de la cepa *Acremonium* sp.4 (040) frente a la cepa *Alternaria* sp.1 (031) se evidenció la producción de exudado y el cambio de color del medio PDA que rodeaba a la cepa *Acremonium* sp.4 (040) (Figura 18). Cabe destacar que este resultado no fue evidenciado cuando *Acremonium* sp.4 (040) fue enfrentado a otras cepas patógenas en cultivos dobles.

En el enfrentamiento dual de la cepa *Acremonium* sp.4 (040) con las cepas de *Alternaria alternata* (046) y *Alternaria* sp.1 (035), se formaron zonas de inhibición fuertes (++++). Por otro lado, no se evidenció zona de inhibición para *Fusarium* sp.1 (049) con ninguna de las cepas candidatas a ser antagonistas que se probaron (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de los posibles antagonistas en la inhibición del crecimiento *in vitro* de patógenos de *Bromus catharticus*, *P. dilatatum* y *P. notatum*.

Antagonistas	Porcentaje de inhibición de crecimiento (PGI) ^a categoría de inhibición de crecimiento (CIC) ^b del patógeno y zonas de inhibición ^c														
	Patógenos														
	<i>Alternaria alternata</i> (046)			<i>Alternaria sp.1</i> (035)			<i>Curvularia clavata</i> (048)			<i>Curvularia pallescens</i> (044)			<i>Fusarium sp.1</i> (049)		
	PGI	CIC	Zonas de inhbcion	PGI	CIC	Zonas de inhbcion	PGI	CIC	Zonas de inhbcion	PGI	CIC	Zonas de inhbcion	PGI	CIC	Zonas de inhbcion
<i>Acremonium sp.3</i> (033)	91,42	4	+	91,35	4	-	55,43	3	+++	76,18	4	+++	6,3	1	-
<i>Acremonium sp.4</i> (040)	77,14	4	++++	86,41	4	++++	48,6	2	+	50,47	2	+	12,61	1	-
<i>Acremonium sp.7</i> (050)	44,76	2	+++	23,45	1	++	63,2	3	+	83,8	4	-	17,11	1	-
<i>Acremonium strictum</i> (052)	76,18	4	+	34,56	2	++	44,43	2	++	36,18	2	+	9,91	1	-
<i>Acremonium aff. killiense</i> (064)	39,04	2	+	4,93	1	-	46,6	2	+	28,56	2	+	35,13	2	-
<i>Acremonium sp.6</i> (073)	71,43	3	+++	70,26	3	+++	49,86	2	++	76,18	4	++	11,71	1	-

^a Los datos de la tabla están representados por los valores medios del porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio (PGI) usando la fórmula de Skidmore y Dickinson (1976). ^b Categoría de inhibición de crecimiento del patógeno (CIC) en escala 0-4 donde, 0= no inhibición; 1= inhibición muy débil; 2= inhibición débil; 3= inhibición moderada; 4= inhibición fuerte. ^c Zona de inhibición: (-) = no hay zona de inhibición; (+) = muy débil, 0-5 mm; (++) = débil, 5-10 mm; (+++) = moderada, 10-15mm; (++++) = fuerte, 15-20 mm; (+++++) = muy fuerte), > 2 cm.

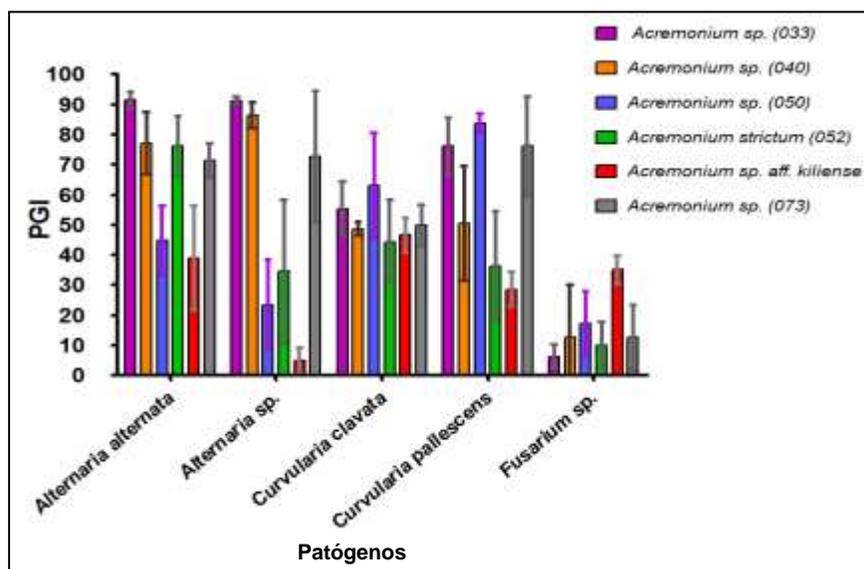


Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio (PGI) de las cepas patógenas en los cultivos dobles frente a las cepas antagonistas: *Acremonium sp.3* (033); *Acremonium sp.4* (040); *Acremonium sp.7* (050); *Acremonium strictum* (052); *Acremonium sp.6* (073) y *Acremonium sp.2 aff killiense* (064), $p < .0001$.

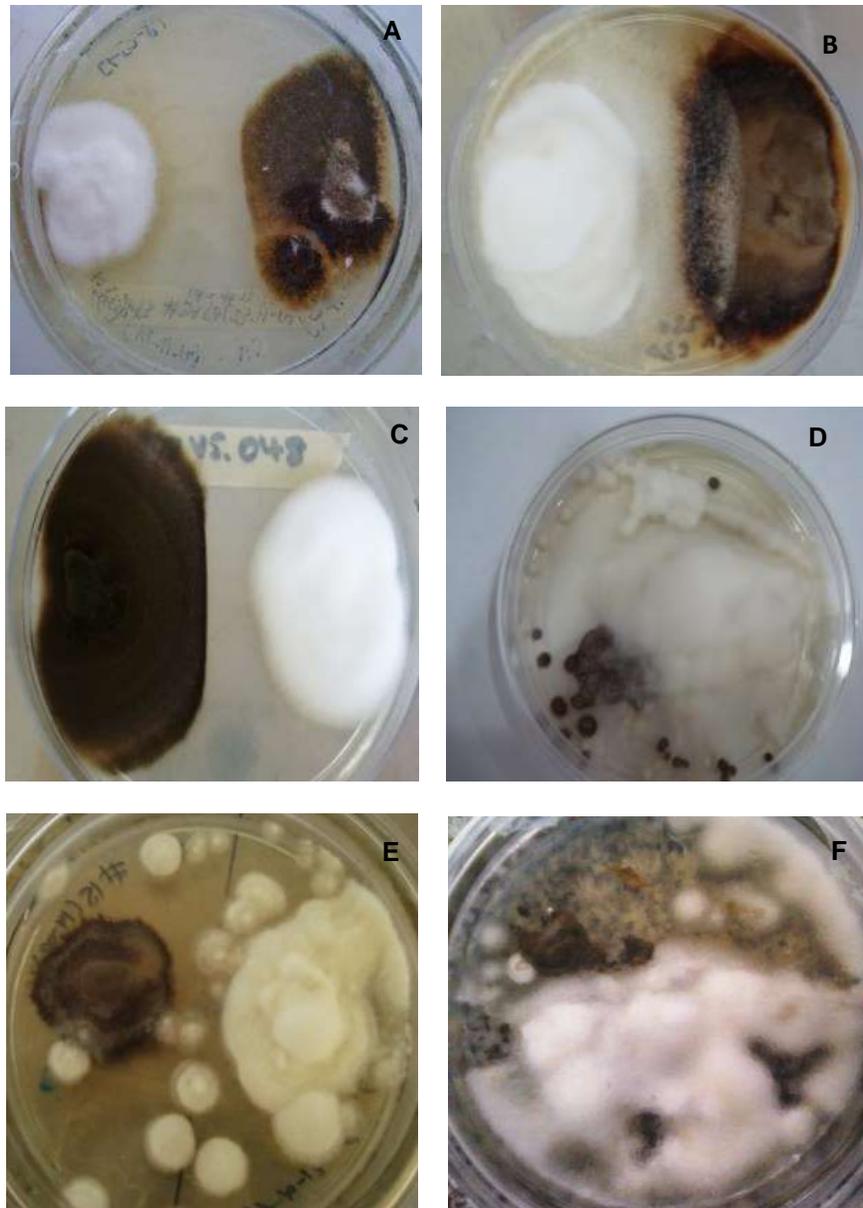


Figura 17. Cultivos dobles después de 3 semanas de inoculación a 28°C. (A) Zona de inhibición entre *Alternaria* sp.1, (035) y *Acremonium* sp.4, (040); (B) cultivo doble de *Acremonium strictum*. (052) y *A. alternata* (046); (C) zona de inhibición entre *Curvularia clavata* (048) y *Acremonium* sp.3 (033); (D) crecimiento de micelio de *Acremonium* sp.6 (073) sobre la colonia de la cepa *A. alternata* (046); (E) cultivo doble de *C. pallescens* (044) y *Acremonium* sp.7 (050), se observaron colonias de *Acremonium* sp.7 (050), creciendo sobre la colonia de *C. pallescens* (044); (F) cultivo doble de *A. alternata* (046) y *Acremonium* sp.3 (033), después de 14 días de inoculación de la colonia de *Acremonium* sp.3 (033) cubrió completamente a la colonia de *A. alternata* (046).



Figura 18. Cultivo doble de la cepa *Acremonium* sp.4 (040) frente a la cepa patógena *Alternaria* sp.1 (035), donde se evidencia cambio de color en el medio PDA circundante a la cepa de *Acremonium* y producción de exudado en el micelio.

6.4. Producción de extractos fúngicos.

Se obtuvieron veinte tres extractos del medio extracelular de hongos crecidos en medio líquido químicamente definido para especies endófitas (Bacon y White, 1994). Los aislamientos presentaron diferentes características respecto a la coloración y pH final del medio líquido (Figura 19 y Tabla 3). Del total de 23 aislamientos, 11 produjeron abundante micelio, propágulos y óptimo crecimiento a los 10 días de cultivo en agitación. A estos cultivos se les realizó extracción por medio de solventes orgánicos (Tabla 3) y cromatografía en capa delgada (TLC). 12 aislamientos no presentaron crecimiento de micelio óptimo, evidenciándose por el crecimiento de pocas colonias y fibras de micelio al cabo de 20-25 días de agitación orbital. Siete de estos doce aislamientos presentaron contaminación bacteriana y fueron descartados.

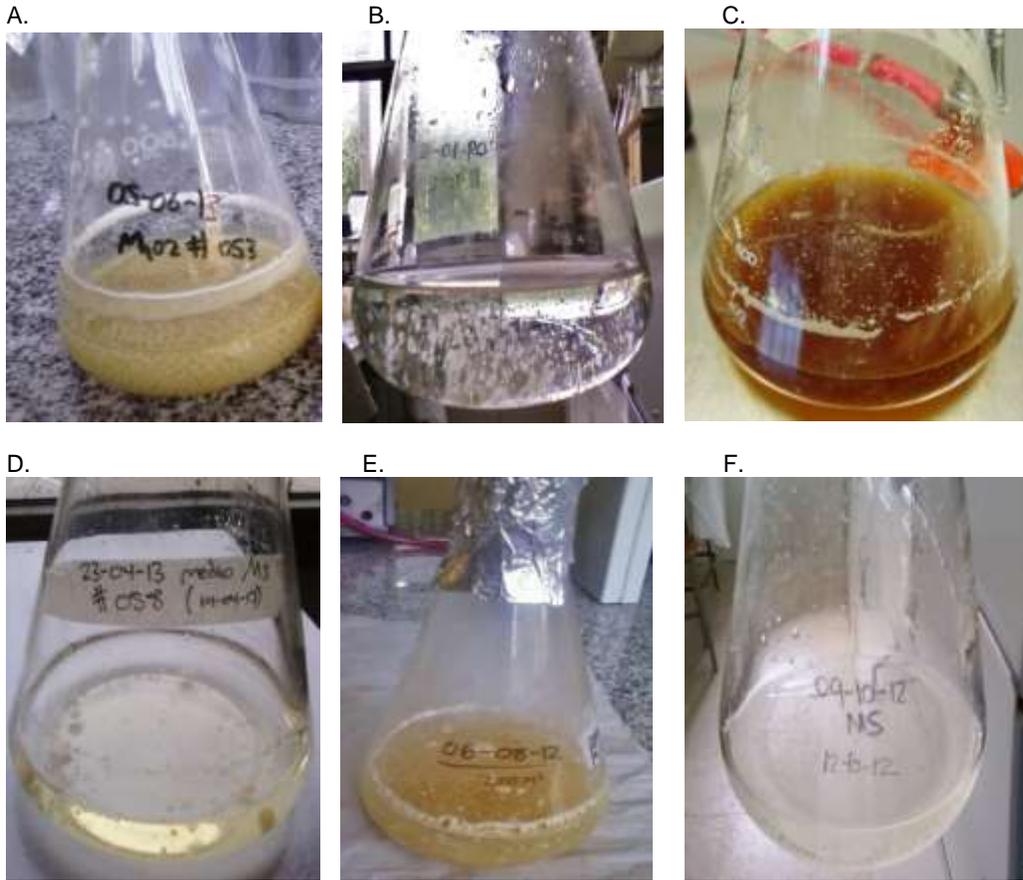


Figura 19. Cultivos líquidos de algunas cepas endófitas en medio SM (Bacon y White, 1994). A: cultivo líquido de la cepa *Acremonium* sp.5 (053), B: cultivo líquido de la cepa *Acremonium* sp.6 (050), C: cultivo líquido de *Acremonium* sp.4 (040) SM, D: cultivo líquido de *Acremonium* sp.5 (058), E: cultivo líquido de *Acremonium* sp.2 aff. *killiense* (064), F: cultivo líquido de *Acremonium strictum* (039).

Tabla 3. Cepas endófitas utilizadas para la producción de metabolitos secundarios, características de los medios de cultivo y de los extractos fúngicos obtenidos.

Cepas endófitas	Medio líquido SM volumen (ml)	Observaciones del crecimiento y del medio	Solvente de extracción y volumen empleado	Extracto fúngico obtenido peso (mg)	Características del extracto evaporado
<i>Aspergillus</i> sp.1 (021)	150	Crecimiento micelial de color blanco con esporas verdosas en el medio, medio cristalino. pH inicial: 5,6 – pH final: 6,0	Acetato de Etilo (AcOEt) 150ml	3,7	Extracto en polvo de color amarillo, se observa a manera de cristales en el frasco, diluibles en AcOEt
<i>Aspergillus niger</i> (024)	150	Crecimiento micelial de color blanco con esporas adheridas de color negro, medio cristalino. pH inicial: 5,6- pH final: 4,4	AcOEt 150ml	1,4	Extracto evaporado de aspecto ceroso, de color beige, en el fondo del frasco
<i>A. niger</i> (024) Mi.*	150	Extracto realizado a partir de micelio crudo de la colonia en medio PDA. pH inicial: 5,7 – pH final: 6,4	AcOEt isopropanol y sonicación 20min	19,7	Extracto de aspecto polvoso de color blanco, se diluye en AcOEt
<i>Acremonium strictum</i> (039)	150	Crecimiento micelial pequeñas, de color blanco, medio sin cambio de color, cristalino. pH inicial: 5,7- pH final: 7,0	Metanol 250ml	2,3	Extracto de color beige cremoso, de aspecto ceroso, adherido al frasco, no se diluye en AcOEt, dilución en Metanol
<i>Acremonium</i> sp.4 (040) SM	150	El medio cambio a color café -caramelo, crecimiento micelial pequeñas de color blanco. pH inicial: 5,7 – pH final: 6,0	AcOEt 250ml	137,1	Extracto en forma de cristales, de color blanco, diluibles en AcOEt
<i>Acremonium</i> sp.4 (040) Ex*	150	Extracto realizado de la colonia que presentó exudado en forma de gotas de color amarillo por encima del micelio, en el cultivo doble de la cepa (040) vs <i>Alternaria brassicicola</i> (031)	AcOEt + acetoneitrilo y sonicación por 20min	3,3	Extracto de aspecto ceroso, adherido al frasco, de color beige, cremoso, diluible en metanol
<i>Acremonium</i> sp.4 (040) Ac	150	Se realizó la extracción del micelio crudo en un cultivo puro de la colonia (040) en medio PDA	AcOEt + acetoneitrilo y sonicación por 20min	2,7	Extracto en forma de láminas de color blanco diluible en AcOEt
<i>Acremonium</i> sp.5 (053)	150	Crecimiento micelial de color beige crema, en el medio líquido, el medio continuo transparente, micelio blanco en el borde del frasco. pH inicial: 5,7 – pH final: 7,0	AcOEt 250ml	57,6	Extracto en forma de láminas de color blanco diluible en AcOEt
<i>Fusarium</i> sp.2 (059) Mi.*	150	El medio cambio a color amarillo ocre, turbio, con micelio de forma irregular. pH inicial: 5,7 – pH final: 6,0	AcOEt 250ml	2,8	Extracto en forma de láminas de color amarillo, diluibles en AcOEt
<i>Acremonium</i> sp.6 (050)	150	Crecimiento micelial de color blanco, medio líquido cristalino. pH inicial: 5,7 – pH final: 8,0	AcOEt 250ml	1,5	Extracto de aspecto ceroso, adherido al frasco, de color beige, cremoso, diluible en metanol

<i>Acremonium</i> sp.5 (058)	150	Crecimiento micelial de color beige crema, en el medio líquido, el medio continuo transparente, micelio blanco en el borde del frasco. pH inicial: 5,7 – pH final: 7,0	AcOEt 250ml	3,1	Extracto en forma de láminas o polvoso de color blanco diluible en AcOEt
<i>Acremonium</i> sp.2 aff. <i>kiliense</i> (064)	150	Crecimiento micelial de color beige crema, en el medio líquido, medio líquido de color amarillo y cristalino. pH inicial: 5,7 – pH final: 6,3	AcOEt 250ml	2,4	Extracto en forma de polvo o cristales, de color beige, diluible en AcOEt

*Mi= micelio fúngico, cepas de las cuales se realizó extracción a partir de micelio crudo en cultivo sólido PDA.

*Ex= exudado en el micelio de cepa antagonista en cultivo doble con cepa patógena.

6.5. Perfiles cromatográficos en capa delgada (TLC) de los extractos.

En la extracción de los cultivos líquidos 039, 040Mi, 040ex, con el solvente orgánico AcOEt, se evidenció que la separación de la fase acuosa y la fase orgánica no se realizó óptimamente en el balón decantador, se presentaron tres capas; una cristalina en la parte superior, otra de textura y color crema en la parte media y una tercera capa en la parte inferior del balón que conservaba el color del medio líquido SM. Por esta razón, para posibilitar la extracción de compuestos a partir de los cultivos líquidos de 039, 040Mi y 040ex, se centrifugaron a 8000rpm por 5 minutos cada uno, con lo cual se logró separar las dos fases adecuadamente. En los demás cultivos líquidos analizados se evidenció la formación clara de las dos fases en el balón por lo cual no fueron sometidos a centrifugación. Posteriormente, se realizaron corridas cromatográficas en capa delgada (TLC) a fin de comparar los compuestos obtenidos mediante ambas técnicas (extracción con balón y extracción con centrifugación).

En las corridas de TLC de los extractos 039, 040, 040 ex, usando como solvente de corrida hexano-acetato (1:1), se evidenció la migración de los compuestos originando la formación de franjas o manchas en la placa cromatográfica bajo la observación con luz UV (Figura 20A). La corrida de TLC realizada con los compuestos extraídos por medio de la técnica de centrifugación y con diclorometano-metanol (15:1) como solvente de corrida, presentó mayor migración de los compuestos y para los compuestos 039 y 040, se evidenció la aparición de varias manchas bajo luz UV (Figura 20B). La placa cromatográfica realizada con los compuestos extraídos en el balón y con diclorometano-metanol (15:1) como solvente de corrida, presentó menor migración y para los compuestos 039 y 040 no se evidenció la aparición de manchas bajo luz UV (Figura 20C). Los valores calculados de Rf para los extractos fúngicos analizados fueron:

Rf 039 (Figura 20A) = 0,15

Rf₁ 040 (Figura 20A) = 0,33

Rf₂ 040 (Figura 20A) = 0,78

Rf₁ 040 (Figura 20B) = 0,62

Rf₂ 040 (Figura 20B) = 0,72

Rf₃ 040 (Figura 20B) = 0,88

Rf₁ 040ex (Figura 20C) = 0,17

Rf₂ 040ex (Figura 20C) = 0,33

Rf₃ 040ex (Figura 20C) = 0,55

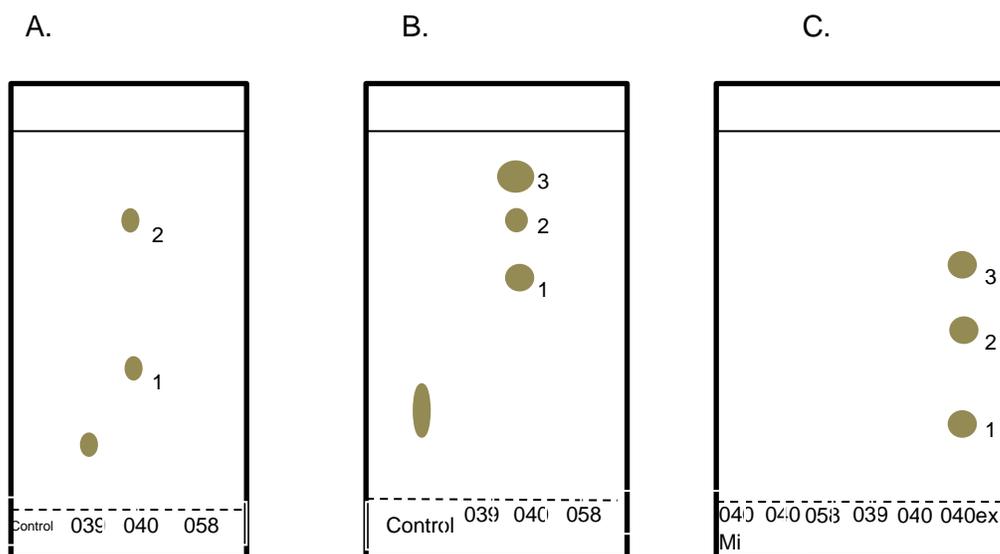


Figura 20. Diagrama de las placas cromatográficas obtenidas de los compuestos fúngicos extraídos en AcOEt. A: placa luego de la separación de los extractos fúngicos 039, 040 y 058 a partir de cultivo líquido SM, extraídos con el solvente orgánico AcOEt; solvente de corrida hexano-acetato (1:1); B: placa luego de la separación de los extractos fúngicos 039, 040, 058 que se sometieron a centrifugación y el alcaloide Brucina usado como control de corrida; solvente de corrida diclorometano-metanol (15:1); C: placa luego de la separación de extractos fúngicos 040Mi, 040, 058, 039, 040Ex, extraídos en el balón sin centrifugación y con diclorometano-metanol (15:1) como solvente de corrida.

6.6. Análisis de los extractos mediante espectrometría de masa (ESI-QToF).

Con el propósito de realizar un análisis preliminar de los extractos, se los separó mediante espectrometría de masa con el instrumento (ESI-QToF). Los espectros de cada extracto fueron analizados con el programa DataAnalysis de Bruker Compass™ y con programas de versión libre online como Massbank.jp (Massbank, 2013) para la predicción de compuestos y formulas químicas. Se evidenció una gran variedad de picos en los espectros cromatográficos de los extractos fúngicos (Anexo 3). Sin embargo, este análisis preliminar no arrojó resultados concluyentes con significado biológico relevante.

6.7. Pruebas de actividad antimicrobiana, técnica de “Excavación- placa- cultivo” de los extractos fúngicos contra cepas fúngicas fitopatógenas.

En las pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos, disueltos en DMSO, se obtuvieron distintos efectos. El crecimiento de algunas cepas patógenas se detuvo en la zona cercana al pozo con extracto fúngico, mientras que otras cepas crecieron incluso por encima del pozo con extracto fúngico (Figura 21). A nivel general, las cepas de *Acremonium* spp. mostraron actividad antifúngica contra las cepas patógenas usadas (Tabla 4), deteniendo su crecimiento en la zona cercana al pozo donde estaba el extracto fúngico y formando halo de inhibición. Los extractos fúngicos de las cepas *Acremonium* sp.4 (040) y *Acremonium* sp.5 (058), presentaron los mejores resultados inhibiendo el crecimiento de micelio de la mayoría de patógenos probados. La cepa *Fusarium* sp.2 (062) fue inhibida por la mayoría de los extractos probados a excepción del extracto *Acremonium* sp.2 *aff. kiliense* (064).

Tabla 4. Pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos.

Antagonistas	<i>Aspergillus</i> sp.1 (021)	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i> (024)	<i>Alternaria</i> <i>brassicicola</i> (031)	<i>Alternaria</i> <i>alternata</i> (046)	<i>Curvularia</i> <i>pallescens</i> (037)	No identificado (038)	<i>Curvularia</i> <i>pallescens</i> (044)	<i>Curvularia</i> <i>clavata</i> (048)	<i>Fusarium</i> sp.1 (049)	<i>Fusarium</i> sp.2 (062)
<i>Acremonium</i> <i>strictum</i> (039)	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1
<i>Acremonium</i> sp.4 (040 ¹ SM)	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
<i>Acremonium</i> sp.4 (040 ex ²)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1
<i>Acremonium</i> sp.4 (040 ac ³)	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1
<i>Acremonium</i> sp.7 (050)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Acremonium</i> Aff <i>Killiense</i> (064)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Acremonium</i> sp.5 (058)	-	-	1	-	1	1	-	1	-	1
Control negativo con DMSO al 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Extractos fúngicos de las cepas antagónicas probadas. 1. *Acremonium* sp.4 (040) obtenido en medio líquido SM; 2. *Acremonium* sp.4 (040) ex, obtenido del exudado en enfrentamiento dual contra la cepa *C. clavata* (048); 3. *Acremonium* sp.4 (040) ac, obtenido de micelio crudo extraído con Acetonitrilo. Resultado expresado con 1 o 0, donde 1= inhibición o actividad positiva y 0= inhibición o actividad negativa, número de réplicas n= 3.

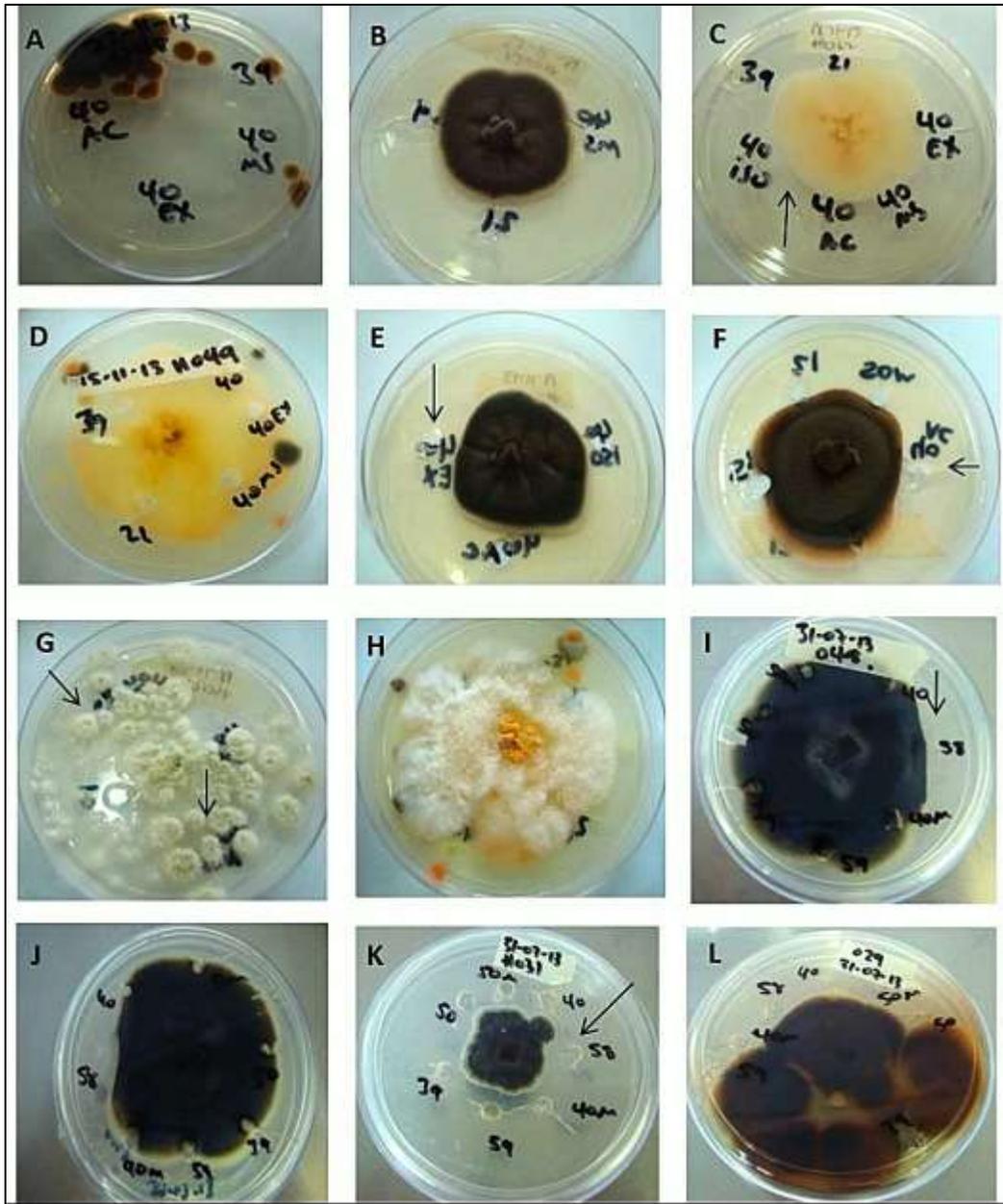


Figura 21. Pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos. A: cepa 048 vs extractos 039, 040 AC, 040, 040 ex. B: cepa 046 vs extractos 040, 051, 064. C: cepa 062 vs extractos 039, 040, 040 ex, 040 AC, 051. D: cepa 049 vs extractos 021, 039, 040, 040 ex, 040 AC. E: cepa 046 vs extractos 040ex, 040 AC, 040. F: cepa 038 vs extractos 039, 040, 040 AC, 040ex, 050, 051. G: cepa 021 vs todos los extractos. H: cepa 049 vs todos los extractos. I: cepa 048 vs todos los extractos probados. J: cepa 048 réplica 2 vs todos los extractos probados. K: cepa 031 vs extractos 039, 040, 040AC, 050, 058, 059. L: cepa 029 vs extractos 039, 040, 040 AC, 050, 058, 059. (Las flechas dentro de la foto indican el lugar donde estaba el extracto que presentó efecto inhibitorio).

7. DISCUSION

7.1. Hongos endófitos aislados de especies forrajeras

En este estudio, se observó el mayor porcentaje de infección endófitas en plantas de *B. catharticus* colectadas en Funes. Una posible explicación se deba a las diferencias de manejo agronómico y a las características morfológicas y genéticas de las especies vegetales presentes en las dos zonas de muestreo estudiadas. La zona de Funes pertenece a un pastizal naturalizado con baja intervención antrópica, que se encuentra entre cultivos de hortalizas con manejo orgánico de una antigüedad de 10 años, mientras que la zona de Zavalla presenta una pastura implantada con un manejo agronómico convencional, periodos de resiembra anual y bianual en donde, las semillas principalmente de forrajeras como *Festuca arundinacea*, *Lolium multiflorum* y *Bromus bibersteinii*, generalmente tienen un tratamiento antifúngico previo, la transmisión de endófitos estaría dada por las esporas que persisten en el suelo que colonizan nuevos hospedantes (Walsh *et al.*, 2010). Por otro lado las especies de *Paspalum* evaluadas se encuentran de forma esporádica y como pasto de jardín en las inmediaciones del campus, con antigüedad que va de dos a tres años. La especie *P. dilatatum* de la zona de Zavalla mostró el 33% de infección endófitas. De acuerdo con White, (1988), las gramíneas del género *Paspalum* han coevolucionado con especies endófitas fúngicas (White, 1988).

No se obtuvieron aislamientos fúngicos de las hojas, tallos y semillas de las especies de *Festuca arundinacea* y de *Lolium multiflorum*. Este hecho puede ser consecuencia de los tratamientos antifúngicos realizados a las semillas con el fin de evitar infecciones endófitas no deseadas causantes de enfermedades en el ganado como la festucosis (Gamboa, 2006). Por otro lado, es importante resaltar que los cultivares de *Festuca* y *Lolium* de los predios de la facultad, son pasturas no tóxicas para el ganado (comunicación personal, Ing Agr. Julio Galli, docente de la FCAgr, 2013).

Los taxones endófitos dominantes comúnmente encontrados en pastizales difieren según la región en estudio. Los resultados obtenidos por Stone *et al.*, (2004), White y Backhouse (2007), Porrás Alfaro *et al.*, (2008), Khidir *et al.*, (2010) y Sánchez-Márquez *et al.*, (2012), demostraron que los grupos de taxones endófitos dominantes en gramíneas de lugares templados son: *Alternaria*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Epicoccum* y

Aureobasidium spp. Estos estudios sugieren que las especies endófitas dominantes de gramíneas templadas y tropicales parecen tener una baja especificidad de huésped, encontrándose en múltiples especies de pastizales (Sánchez-Márquez *et al.*, 2012).

La micobiota endófitas asociada a una pastura en particular usualmente consiste en un número relativamente grande de especies fúngicas y una distribución muy desigual de riqueza en los aislamientos entre las especies fúngicas típicas en los estudios con endófitos (Sánchez-Márquez *et al.*, 2012). Se ha indicado que “el número de especies identificadas en un conjunto endófito depende del número de plantas y los lugares analizados” (Sánchez-Márquez *et al.*, 2012), que existe una correlación positiva entre la complejidad espacial y la riqueza de especies y que la diversidad beta (la tasa de cambio en especies de dos comunidades vegetales adyacentes o dentro de un individuo hospedante), es un factor importante para la determinación de la estructura de la micobiota endófitas (Whittaker *et al.*, 2001). Es importante tener en cuenta que las diferencias entre el tamaño de hoja, la estructura anatómica y los componentes químicos entre especies de gramíneas y dentro de la misma planta pueden afectar a la diversidad de los hongos que se encuentran en ellos (Wong y Hyde, 2001; Sánchez-Márquez *et al.*, 2012).

El género *Acremonium* del orden Hypocreales (Ascomycota), es quizás el grupo endófito más interesante entre los hongos aislados en este trabajo. Dentro del grupo Ascomycota, los órdenes Pleosporales e Hypocreales dominan en términos de abundancia en especies de gramíneas de zonas templadas, en contraste, los órdenes Xylariales y Phyllachorales son los taxa más comunes de gramíneas tropicales (Porrás Alfaro *et al.*, 2008). En este estudio, el género *Acremonium* fue detectado en especies gramíneas cosmopolitas de zonas templadas como *Bromus* y tropicales como *Paspalum*, que es una gramínea adaptada a zonas templadas altamente resistente a los cambios de estación (Zuloaga y Morrone, 2005). Dado que los hongos endófitos del género *Acremonium* se aislaron de varias de las especies colectadas, inferimos que se trata de un género cosmopolita, que puede ser encontrado asociado a más de una especie gramínea, en particular a aquellas bien adaptadas a las condiciones medioambientales, característica que puede atribuirse en parte a la simbiosis endofítica que presentan. Según lo que conocemos, no existen reportes de la presencia de especies de *Acremonium* aisladas asociadas a estas especies

forrajeras, por lo que este resultado aportaría al listado de los reportes de endófitos del orden Hypocreales en zonas templadas.

Acremonium incluye algunos de los hongos filamentosos anamórficos más simples a nivel estructural, que facilitan su clasificación a nivel de género mediante el uso de claves taxonómicas. Poseen características morfológicas que consisten en hifas septadas que dan lugar a fialides delgadas, producidas en pequeños grupos o simples. Las conidias tienden a ser unicelulares, producidas en cabezas mucoides o cadenas sin conexión, pueden ser hialinas o melanizadas, pero la hifa generalmente es hialina (Summerbell *et al.*, 2011). Dadas estas características, la identificación taxonómica de las cepas aisladas de género *Acremonium* fue relativamente sencilla y se realizó mediante observación microscópica de los microcultivos obtenidos.

Las especies de *Acremonium* incluidas en el grupo Hypocreales, forman una matriz que abarca a clados pobremente diferenciados y a clados que están bien diferenciados, que en su mayoría no corresponden a los géneros previamente reconocidos o a taxones supra-genéricos. Dentro del grupo Hypocreales, en el clado Sarocladium, que ha sido distinguido como “El clado *strictum*”, se encuentra la especie aislada *Acremonium strictum*, junto con *A. killiense* y *A. zaeae*, un hongo patógeno del maíz. Ningún hongo teleomorfo está asociado a este clado, el cual consiste en hongos que forman conidias en cabezas mucoides y está estrechamente relacionado al clado de especies formadoras de conidias catenuladas. Los clados “*Acremonium bacillisporum*” y “clado *strictum*” forman el clado llamado “*Sarocladium*” (Summerbell *et al.*, 2011).

La especie aislada *Acremonium strictum* se considera un hongo cosmopolita, el cual es comúnmente aislado de una gran variedad de sustratos. Por ejemplo, ha sido encontrado sobre muchos hongos saprófitos y varios hongos fitopatógenos debido a su característica de hongo micoparásito polífago (Gams *et al.*, 2004). Es una especie que posee una gran diversidad genética y puede ser encontrado como patógeno, siendo un hongo queratinofílico y dermatofito causando infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos (Krcmery *et al.*, 1993; Schell y Perfect, 1996; Warris *et al.*, 2000). También es un patógeno del maíz (Tagne *et al.*, 2002). Dadas sus características farmacológicas y en particular, su habilidad de crecer sobre otros hongos como parásito

fúngico polífago, fue utilizado como hongo antagonista en los cultivos dobles contra especies patógenas.

El género *Acremonium*, posee cualidades favorables que lo ubican como un buen agente para el control de enfermedades causadas por patógenos fúngicos en plantas, entre ellas, la capacidad de sintetizar sustancias antibióticas, compuestos alcaloides, metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y mecanismos de acción como el micoparasitismo y competencia por nutrientes. Sin embargo, este género se encuentra entre los taxones menos estudiados (Gams *et al.*, 2004).

7.2. Evaluación de cepas antagonistas para el control biológico de cepas patógenas fúngicas. Pruebas de antagonismo- cultivos dobles.

En los cultivos dobles de las cepas de *Acremonium* spp. con *Alternaria* sp.1 (035) y *Alternaria alternata* (046), el mayor efecto antagónico se obtuvo con la cepa *Acremonium* sp.3 (033) logrando un resultado muy similar con la cepa *Acremonium* sp.4 (040). Ambos porcentajes de inhibición permitieron clasificar a estas cepas antagonistas en la categoría más alta para la inhibición de crecimiento micelial del patógeno (CIC). No se encontraron diferencias significativas ($p < .0001$) entre estas cepas antagonistas para el control de las cepas de *Alternaria* evaluadas. Sin embargo, es interesante observar las zonas de inhibición en los cultivos dobles con las cepas patógenas de *Alternaria* sp.1 cepa (035) y *A. alternata* cepa (046). En este caso, ambas cepas antagonistas presentaron un comportamiento distinto, existiendo una zona de inhibición fuerte en los cultivos dobles con la cepa *Acremonium* sp.4 (040) y una zona de inhibición débil e inexistente en los cultivos dobles con *Acremonium* sp.3 (033).

Este resultado permitió inferir que, a pesar de presentarse un efecto antagónico similar, el mecanismo de acción de las cepas antagónicas para el control biológico de las cepas patógenas es distinto. En el caso del cultivo doble de *Acremonium* sp.3 (033), el mecanismo de antagonismo involucrado más probable es el de micoparasitismo (Gams *et al.*, 2004). Esta conclusión se basa en la observación de que la cepa *Acremonium* sp.3 (033) crece tanto sobre *Alternaria* sp.1 como *A. alternata* y termina cubriendo todo el medio en la caja de Petri, impidiendo el desarrollo y crecimiento de las cepas patógenas (Figura 17F). Por el contrario, el mecanismo de antagonismo para la cepa *Acremonium*

sp.4 (040) podría ser la producción y liberación de metabolitos secundarios por parte de la cepa antagonista en el medio, que impiden el desarrollo del hongo patógeno. Otra posibilidad es que exista competencia por nutrientes. Un efecto antagónico positivo indica posible competencia por nutrientes entre ambas especies (Wilson *et al.*, 1991), ya que se ha observado que las cepas patógenas detienen su crecimiento en medios de cultivo escasos de nutrientes (Heuvel, 1971; Mishra y Tewari, 1976). Por otro lado, la competencia con otros hongos puede promover que la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana sea seleccionada positivamente.

Los estudios de Wicklow *et al.*, (2005) evidenciaron que la actividad antimicrobiana de *Acremonium zeae* en gramíneas es debido a la producción de pyrrocidinas, componentes que parecen aumentar las defensas de la planta frente a patógenos fúngicos y bacterianos (Wicklow *et al.*, 2005; Sánchez-Márquez *et al.*, 2012). El efecto antagónico de la especie *Acremonium strictum* (052) frente a la cepa *A. alternata* (046) fue positivo con un PGI alto. Para esta especie en particular, el mecanismo de antagonismo más probable, al igual que el del antagonista *Acremonium* sp.3 (033), es el de micoparasitismo debido a la capacidad que presenta *A. strictum* de crecer sobre otros hongos (Gams *et al.*, 2004).

En los cultivos dobles de las cepas *Alternaria alternata* (046) y *Alternaria* sp.1 (035) con la cepa antagonista *Acremonium* sp.2 *aff killiense* (064), se observó una diferencia no significativa entre su efecto antagónico contra *Alternaria* sp.1 (bajo) y *A. alternata* (moderado). Este resultado podría deberse en parte, a que la cepa *Acremonium* sp.2 *aff killiense* (064) presentó una tasa de crecimiento menor a la mostrada por las otras cepas estudiadas, con lo cual se infirió que la competencia por recursos en el medio es más débil para esta especie. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, es una especie cosmopolita que aparece en muchas clases de plantas y sustratos, incluyendo suelo, alimentos y textiles (Ellis, 1971). Algunos autores lo consideran un hongo fitopatógeno de poca a moderada importancia (Shew y Lucas, 1991; Arias *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios de Domsch *et al.*, (1980) han demostrado que puede llegar a causar abundantes síntomas en la planta. Por otra parte, se reportó la toxicidad en animales por la ingesta de pasturas infectadas con este hongo (Domsch *et al.*, 1980; Arias *et al.*, 2006). Aislar y caracterizar cepas antagonistas que inhiban o supriman el crecimiento de *A. alternata* podría contribuir a desarrollar una buena herramienta para el control de este patógeno y reducir los riesgos de infección por este hongo en muchos cultivos.

Los cultivos dobles de las cepas antagónicas con las cepas del género *Curvularia*, mostraron resultados similares aunque con (PGI) menores a los encontrados con las cepas de *Alternaria* spp. Sin embargo, la cepa de *Acremonium* sp.7 (050) exhibió una mayor actividad antagónica contra *Curvularia pallescens* que con las cepas de *Alternaria* evaluadas. En el cultivo doble con la cepa de *C. pallescens* (044), el mecanismo de antagonismo de *Acremonium* sp.7 (050) parece ser el micoparasitismo, dado que el análisis microscópico (Anexo 4) evidenció abundantes esporas del antagonista rodeando a las esporas del *C. pallescens*, las cuales tienen mayor tamaño e incluso se encuentran obstaculizando los poros germinales de las esporas de *C. pallescens*. También se observaron hifas de *Acremonium* sp.3 (033) invadiendo estructuras fúngicas del patógeno.

Por otro lado, en el cultivo doble de la cepa *C. pallescens* (044) con la cepa antagonista *Acremonium* sp.3 (033), se evidenció una zona de inhibición moderada, en donde el mecanismo de antagonismo propuesto es la producción de metabolitos secundarios. A partir de este resultado, se podría inferir que las interacciones y los mecanismos de antagonismo de una misma cepa antagónica, varían según las cepas patógenas en los cultivos *in vitro* a las cuales se enfrentaron. El análisis de varianzas indicó que existen diferencias altamente significativas entre la interacción del efecto de antagonistas y patógenos. De lo expuesto se puede inferir que las cepas patógenas podrían modular o influir en la respuesta en la cepa antagonista y viceversa. Este hecho quedó demostrado por los valores similares de PGI presentados por una misma cepa antagónica ante distintas cepas patógenas, contrastando con las diferencias observadas entre las zonas de inhibición.

Curvularia spp., *Stemphylium* spp., y algunas especies del género *Alternaria*, son reconocidos patógenos de semillas en *P. dilatatum* (Madia y Schrauf, 1999). *Curvularia* spp. son las causantes del marchitamiento en muchas especies de gramíneas entre las que se incluye a *Bromus* spp., *Festuca* spp. y *Paspalum* spp. La marchitez se da cuando la gramínea está predispuesta a la enfermedad o se encuentra bajo estrés por altas temperaturas (Madia y Schrauf, 1999).

Fusarium spp. son también hongos cosmopolitas, encontrados frecuentemente sobre restos vegetales de numerosas plantas como saprófitos. Los cultivos dobles de las cepas

probadas frente a la cepa de *Fusarium* sp.1 no mostraron actividad antagónica, donde la cepa *Fusarium* sp.1 creció óptimamente en presencia de los hongos antagónicos. Asimismo, tuvo una mayor tasa de crecimiento en los cultivos dobles, donde no se evidenció presencia de halo inhibitorio. Se obtuvo el mismo resultado para la cepa *Fusarium* sp.2 (no incluida en el análisis estadístico), donde no se observó disminución de crecimiento en ninguna de las tres réplicas.

La cepa de *Acremonium* sp.2 *aff killiense* (064) presentó los menores porcentajes de inhibición contra *Alternaria* spp. y *Curvularia* spp., y fue la única cepa antagonista que ejerció un leve efecto sobre el crecimiento de *Fusarium* sp.1. Wicklow *et al.*, (2005) evaluaron el efecto antagónico de cepas de *Acremonium* spp. frente a *Fusarium verticilloides* en cultivos dobles y demostraron que *Acremonium* spp. interfieren con el rápido crecimiento de *F. verticilloides* debido en gran medida a la producción del antibiótico y antifúngico pyrrocidina, cuya síntesis se activa en presencia de *F. verticilloides* (Wicklow *et al.*, 2005). Por otro lado, factores del medio de cultivo, entre otros no determinados, pudieron interferir en el resultado obtenido para los inóculos de *Fusarium* evaluados en los cultivos dobles con *Acremonium* sp.2 *aff. Killiense* (064) (Redlin y Carris, 1996).

Un hecho que puede influir en el efecto antagónico de las cepas estudiadas, es que presenten una tasa de incorporación de nutrientes, de metabolismo y de crecimiento superior a la de las cepas patógenas (Droby *et al.*, 1990). Sin embargo, la tasa de crecimiento de los hongos endófitos tiende a ser más lenta (Redlin y Carris, 1996), por lo cual, la producción de metabolitos secundarios, así como la de enzimas hidrolíticas (celulasas, glucanasas, quitinasas) que pueden favorecerse en presencia de la competencia por nutrientes contra otra cepa, podrían estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiendo al antagonista un aprovechamiento más eficiente del medio y privando al patógeno de usar los recursos (Whipps y McQuilken, 1993).

Por otro lado, los hongos endófitos producen algunas sustancias únicamente *in planta*, no detectándose las mismas en cultivos *in vitro*. Este se postula como otro mecanismo por el cual los endófitos confieren protección a la planta (Mejía *et al.*, 2008). Si bien los endófitos que muestran efectos antagónicos por vía antibiosis (producción de metabolitos bioactivos) tienden a ser de crecimiento lento y ser relativamente menos abundantes, los

estudios *in planta* con estos hongos endófitos pueden tener un efecto de enmascaramiento por la presencia de otras especies saprófitas de mayor abundancia y rápido crecimiento (Mejía *et al.*, 2008).

Estudios de Strobel *et al.*, (1997) han demostrado la producción de leucinastatina A, un antibiótico que presenta efectos antifúngicos y propiedades anticancerígenas, por parte de *Acremonium* spp. También se ha demostrado la producción de β - glucano por la especie *Acremonium killiense*, compuesto con propiedades antitumorales y que puede jugar un importante papel en la patogenicidad fúngica en plantas (Pitson *et al.*, 1997). Se ha considerado que esta especie también es productora de enzimas capaces de degradar el β - glucano (Pitson *et al.*, 1997).

7.3. Producción de extractos fúngicos.

En términos generales, el protocolo de cultivo líquido empleado funcionó correctamente, tanto para la obtención de micelio como de extracto de metabolitos de origen fúngico en el medio. Las cepas *Acremonium* sp.2 *aff killiense* (064) y *Acremonium* sp.3 (033) presentaron buen crecimiento en medio sólido (PDA), sin embargo, no lograron crecer óptimamente en medio líquido. El lento crecimiento de estas cepas en medio líquido y la baja cantidad de muestra obtenida por extracción con solventes orgánicos, pudo influir en los resultados negativos del efecto inhibitorio del extracto fúngico de la cepa *Acremonium* sp.3 (033) para el control de crecimiento de micelio de las cepas patógenas. Este resultado contrastó con lo observado en el enfrentamiento dual de esta cepa en medio sólido PDA, donde presentó los valores más altos de PGI.

La producción de metabolitos fúngicos está influenciada por parámetros como la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en el medio, entre otros (Parra, 2006). Por ejemplo, estudios de Paranagama *et al.*, (2007) sobre la producción de metabolitos en cultivos líquidos del endófito *Paraphaeosphaeria quadrisepata*, demostraron que el endófito es capaz de producir seis nuevos metabolitos secundarios cuando se utilizó agua corriente en lugar de agua destilada en el medio de cultivo. Además, cuando se cambiaba el cultivo de sólido a líquido, se observó la producción del compuesto radicicol en lugar de chaetocromina por parte del endófito *Chaetomium chiversii* (Kusari *et al.*, 2012).

La producción de algunos de los compuestos con potencial inhibitorio puede desarrollarse bajo condiciones de escasez de nutrientes como la disminución de las fuentes de C, N o P, lo cual conlleva a que el microorganismo entre en un período de crecimiento lento con alteraciones morfológicas y cambios de metabolismo, conocido como metabolismo secundario (Parra, 2006). Este tipo de metabolismo puede presentarse a partir del día 1 de inoculación con máximos niveles de concentración el día 3 (Zhang *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios de Schimmel *et al.*, (1998) demostraron que el metabolismo secundario se presenta a partir del día 5. Estos estudios indican que los microorganismos pueden producir sustancias de bajo peso molecular con efectos antifúngicos y que su obtención es específica para cada cepa o metabolito de interés (Broberg *et al.*, 2004).

De lo expuesto, se infiere que sería conveniente probar nuevos medios de cultivo líquido que sean más adecuados para el crecimiento de esta cepa en particular. Por otro lado se podría postular que el tipo de antagonismo de *Acremonium* sp.3 (033) es el de competencia por nutrientes o micoparasitismo, en donde la producción de metabolitos bioactivos no es eficiente en cultivos líquidos puros. Sin embargo, podría llegar a producirse en situaciones de competencia, siendo inducida la síntesis de metabolitos por parte del patógeno (Combés *et al.*, 2012).

7.4. Perfiles cromatográficos en capa delgada (TLC) de los extractos.

En cuanto a la metodología de extracción, se evidenció que el empleo del balón decantador para la separación de las fases con el solvente orgánico, resultó poco eficiente para las muestras con posibles sustancias de difícil separación. A pesar de que éste es el método de extracción más comúnmente utilizado (Ault, 1998), no resultó eficiente a la hora de separar las fases acuosa y orgánica de las muestras 039, 040, 058. En cambio, la separación mediante centrifugación por 5 minutos a 8000 rpm resultó eficiente para separar ambas fases. Dado que distintas especies del género *Aspergillus* son reconocidas por ser excelentes productoras de metabolitos bioactivos, las cepas *A. niger* y *Aspergillus* sp.1 fueron usadas como control (Blumenthal, 2003). Sus extractos fueron analizados en paralelo con la muestras de endófitos para poder confirmar la efectividad de los procesos de extracción. que se probaron.

La técnica de TLC presenta importantes ventajas, ya que no requiere purificaciones intensivas, es una metodología rápida, fácilmente reproducible y que permite analizar distintas muestras en una sola corrida, al igual que diferentes analitos en forma simultánea (Clement, 2002). Por medio de corridas de TLC se logró evaluar de forma rápida cuales de los extractos obtenidos presentaban compuestos con posibles metabolitos bioactivos. En este caso, la observación de manchas en los extractos 040 y 040ex las cuales están dentro del rango de Rf óptimo de una buena corrida de TLC, infieren la cepa *Acremonium* sp.4 (040), aislada de *P. dilatatum* podría tratarse de una cepa de interés tanto por su potencial como hongo antagonista, como también por la producción de metabolitos de interés en medio líquido (SM). Los valores de Rf que indican una buena corrida de TLC, con condiciones adecuadas y reproducibles, están en el rango de 0,55-0,77 (Ault, 1998). Por lo tanto, los compuestos con Rf dentro de este rango son particularmente relevantes para un análisis posterior individual. En particular, algunos compuestos detectados en la corrida de TLC del extracto 040 con diclometano-metanol como solvente de corrida y del extracto de la misma cepa a partir de micelio crudo con presencia de exudado (040ex) representan candidatos a ser analizados en detalle.

Sin embargo, se deben considerar todos los valores de Rf en cada mancha, ya que los valores de Rf para un mismo compuesto varían dependiendo del solvente de corrida empleado. Con un solvente menos polar, como el hexano-acetato (polaridad media), se pueden obtener valores de Rf menores al rango mencionado. Este hecho, se evidenció en el resultado de la placa cromatográfica con este solvente (Figura 62A). Por otro lado, si se emplea un solvente con una polaridad muy alta, es posible que se eluyan todos los compuestos que estén presentes en la mezcla sin que ocurra una separación (Clement, 2002), lo cual se traduce en un resultado no concluyente en cuanto a la pureza del compuesto. Por lo tanto, es conveniente realizar varias cromatografías con diferentes solventes de corrida, para abarcar todos los rangos de polaridades y que se puedan evidenciar compuestos desconocidos cuando se evalúan por primera vez extractos fúngicos. El empleo de solventes de polaridad media, como el hexano-acetato y de polaridad alta, como el diclometano-metanol, permitió evidenciar manchas con diferentes Rf para los mismos extractos, como en el caso del extracto 040en, donde el patrón obtenido en la corrida con diclometano-metanol es diferente al evidenciado en la corrida con hexano-metanol.

7.5. Pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos.

El extracto de la cepa *Acremonium* sp.4 (040) crecida en medio líquido SM, presentó actividad antimicrobiana en la prueba de *excavación- placa- cultivo* cuando se lo enfrentó a las cepas patógenas *Alternaria* sp.3 (033) y *Alternaria alternata* (046), observándose que en la zona circundante al extracto fúngico, no crecía micelio del patógeno y se formaba un halo de inhibición. Este resultado coincidió con lo observado en el enfrentamiento dual de la cepa antagonista *Acremonium* sp.4 (040) enfrentada a ambas cepas patógenas de *Alternaria*, las que presentaron detención de crecimiento, halo de inhibición fuerte (++++) y porcentajes de PGI superiores al 70%. Este resultado confirmó que los metabolitos bioactivos producidos por la cepa de *Acremonium* sp.4 y liberados en el medio SM, detienen el crecimiento de cepas patógenas del género *Alternaria*.

En las pruebas de actividad del extracto de la cepa *Acremonium* sp.4 (040) crecida en medio líquido SM frente a las cepas de *C. pallescens*, se observó disminución de su crecimiento. Sin embargo, en los cultivos dobles se observó un halo de inhibición débil (+), lo que permite inferir que quizás la liberación de metabolitos secundarios por parte de la cepa de *Acremonium* sp.4 (040) sea menor cuando se la enfrenta a la cepa de *C. pallescens*. También se evidenció actividad antimicrobiana del extracto obtenido a partir de esta cepa endófito frente a *Fusarium* sp.2 cepa (062). Cabe mencionar que cuando estas cepas fueron enfrentadas en cultivos dobles no se observó inhibición de crecimiento del patógeno. A partir de estos resultados se puede deducir que el medio SM es eficiente para estimular la producción de metabolitos por parte de los hongos endófitos (Bacon, 1985).

Se probaron también los extractos de *Acremonium* frente a cepas del género *Aspergillus*, obteniéndose resultados negativos en todos los casos en cuanto a la inhibición de crecimiento de micelio y actividad antimicrobiana. Es importante resaltar, que estas cepas de *Aspergillus* no fueron consideradas patógenas porque se obtuvieron de plantas que no mostraban síntomas de enfermedad. En futuros estudios, sería interesante incluir las especies de *Aspergillus* en pruebas de antagonismo y actividad antimicrobiana de sus extractos, teniendo en cuenta que se trata de un género cosmopolita, ampliamente distribuido y que puede llegar a ser considerado un endófito antagonista de varias especies patógenas por su habilidad de colonizar rápidamente el medio de cultivo, ser

altamente competitivo por recursos, espacio y por la producción de metabolitos bioactivos (Blumenthal, 2003).

Los extractos fúngicos obtenidos a partir de los cultivos líquidos de las cepas *Acremonium* sp.4 (040) y *Acremonium* sp.5 (058), presentaron los mejores resultados en cuanto a actividad antimicrobiana. Ambos inhibieron el crecimiento de la mayoría de las cepas patógenas a las que se los enfrentó. Por otro lado, los extractos fúngicos de las cepas *Acremonium* sp.7 (050) y *Acremonium* sp.2 *aff. killiense* (064) presentaron la menor actividad antimicrobiana. En el enfrentamiento dual contra las cepas patógenas, la cepa *Acremonium* sp.7 (050) presentó un PGI alto para el control de las cepas de *Curvularia* spp., contrariamente a lo observado en las pruebas con los extractos fúngicos de esta cepa frente a las mismas cepas patógenas. Este resultado podría estar indicando que el mecanismo de control ejercido por la cepa *Acremonium* sp.7 (050) es micoparasitismo y no liberación de metabolitos en el medio.

Por otro lado, la cepa *Acremonium* sp.2 *aff. killiense* (064) presentó los resultados más bajos de inhibición de cepas patógenas. Sólo presentó actividad antimicrobiana contra la cepa no identificada (038), hecho que resalta la importancia de abordar la identificación molecular de la cepa 038, aislada a partir de plantas enfermas de *P. dilatatum*. Es interesante el hecho que el crecimiento de las cepas de *Fusarium* sp.2 (062) (aisladas a partir de plantas enfermas de *B. catharticus*), fue inhibido por todos los extractos fúngicos probados, a excepción del extracto fúngico de la cepa *Acremonium* sp.2 *aff. killiense* (064). Siendo que en los ensayos de cultivos dobles de *Fusarium* sp.2 (062) frente a cepas del género *Acremonium* se obtuvieron resultados negativos para la inhibición de crecimiento micelial, se evidencia una vez más el efecto inductor del medio líquido SM (Bacon, 1985) para la síntesis de metabolitos secundarios.

Asimismo, a partir de estos resultados se puede concluir que: i) la estrategia de control más eficiente para las cepas de *Fusarium* la mostraron los extractos fúngicos de *Acremonium* y ii) las cepas de *Fusarium* presentan un mejor performance que las cepas de *Acremonium* cuando son enfrentadas en cultivos duales. La única excepción fue la cepa *Fusarium* sp.1, cuyo crecimiento no fue inhibido o reducido cuando se la enfrentó a los extractos fúngicos, resultado que concuerda con los ensayos de enfrentamiento dual (esta cepa presentó los menores porcentajes de inhibición de crecimiento).

El extracto fúngico de la cepa *A. strictum* (039) presentó actividad antimicrobiana contra las cepas patógenas *C. pallescens* (037) y (044), la cepa no identificada (038) y *Fusarium* sp.2 (062). En todos los casos, las cepas detuvieron su crecimiento en zonas cercanas al extracto fúngico de *A. strictum*. Por otro lado, el resultado de actividad antimicrobiana frente a la cepa *C. pallescens* (044), coincide con el resultado obtenido en el cultivo doble de ambas especies, en donde, el halo de inhibición de crecimiento es moderada (+++) con un PGI superior al 70%.

La cepa *Acremonium* sp.4 (040) presentó liberación de exudado por encima del micelio en forma de gotas de color caramelo en el cultivo antagónico contra la cepa *Alternaria* sp.1 (031) y se evidenció cambio de color del medio PDA por parte de ambas cepas (Figura 60). El extracto fúngico obtenido a partir del micelio con exudado en cultivo doble de la cepa *Acremonium* sp.4 (040) presentó actividad antimicrobiana contra las cepas *A. alternata* (046), *Alternaria* sp.1 (031) y *Fusarium* sp.2 (062). Esta prueba se realizó a fin de evaluar el efecto de la cepa patógena sobre la estimulación de la producción de metabolitos por parte de la cepa antagonista en el cultivo doble.

Combés *et al.*, (2012) evaluaron los mecanismos de comunicación entre el hongo endófito *Paraconiothyrium variable* y el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en enfrentamientos duales. Se evidenció un fuerte efecto antagónico por parte de *P. variable*. Se postuló que este efecto es consecuencia de los metabolitos secundarios inhibitorios producidos por el hongo antagonista y cuya síntesis fue inducida por la competencia en el enfrentamiento dual con el hongo patógeno. Uno de los metabolitos inducidos fue identificado como ácido 13 oxo-9,11-octadecadeinoico, el cual presenta un efecto negativo en la biosíntesis de beauvericina, una de las micotoxinas más potentes producidas por *F. oxysporum* durante la competencia con el endófito (Combés *et al.*, 2012). Este resultado permite proponer un escenario similar para el extracto fúngico obtenido a partir del exudado de la cepa antagonista *Acremonium* sp.4 (040) en el enfrentamiento dual contra *Alternaria* sp.1 (031) en donde su efecto inhibitorio pueda deberse a la producción de metabolitos secundarios inducidos durante la competencia.

Es importante resaltar que fueron muchas las cepas aisladas de plantas asintomáticas que no pertenecen al género *Acremonium*, como: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Curvularia*

sp.1, *Curvularia* sp.2 aff. *eragrostidis*, *Stemphylium* sp., que podrían ser consideradas como patógenos latentes, causando enfermedad en la planta cuando ésta presenta escases de nutrientes y condiciones de estrés (Redlin y Carris, 1996). Este estudio se limitó a la evaluación de las cepas endófitas del género *Acremonium*, debido a nuestro interés particular en este género como agente de control biológico. Sin embargo, se resalta la importancia de futuros estudios que abarquen las demás cepas aisladas de plantas asintomáticas. Por otro lado, es importante considerar que, si bien se realizaron evaluaciones antagónicas *in vitro* con posibles cepas patógenas causantes de enfermedad en plantas enfermas colectadas, no se confirmó que dichas cepas fueran las principales causantes de los síntomas evidenciados en las plantas. Finalmente, es importante destacar que los resultados que mostraron un efecto directo sobre el desarrollo de cepas patógenas reconocidas como *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., y *Fusarium* spp. son promisorios.

Las cepas seleccionadas de cada especie, tanto patógenas como posibles antagonistas, fueron las que mostraron mejor desarrollo en los cultivos *in vitro*, con buena tasa de crecimiento, pocos requerimientos de nutrientes en el medio, fácil identificación taxonómica y viabilidad a largo plazo en medios de cultivo artificiales. Las cepas seleccionadas podrían ser de utilidad en programas de biotecnología y aplicaciones agronómicas a futuro.

7.6. Consideraciones finales.

Los resultados *in vitro* no necesariamente indican lo que ocurre *in planta*. Sin embargo, los resultados de estudios *in vitro* son muy útiles para la identificación de antagonistas candidatos para el control biológico. Estos estudios también permiten hacer conjeturas sobre los mecanismos por los cuales estas cepas reducen los daños causados por patógenos.

Investigaciones adicionales respecto a los efectos de los endófitos sobre el rendimiento del hospedante, pueden generar aplicaciones útiles para el mejor desempeño de las plantas. Los patógenos sólo representan una pequeña fracción de la microbiota en gramíneas (Sánchez-Márquez *et al.*, 2012). Es necesario el estudio del efecto antagónico de los hongos endófitos, en el cual se analicen los efectos tanto *in vitro* como *in planta*.

Comprender el modo de acción por el cual los hongos simbióticos actúan como antagonistas es importante para su posible aplicación en el control biológico de plagas y para la selección de los antagonistas más eficientes (Golam y Ilag, 1999).

Los resultados obtenidos por cromatografía en capa delgada, permitieron realizar una selección inicial de las cepas y los extractos con mayor potencial para ser aplicados en el control biológico. Estos estudios son de gran valor y representan la etapa preliminar antes de realizar estudios y evaluaciones posteriores de las muestras de interés. La identificación de los metabolitos bioactivos responsables de la actividad antimicrobiana observada será realizada por medio de técnicas como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía gaseosa acopladas a espectrometría de masa.

8. CONCLUSIONES.

1. Este estudio permitió demostrar que las especies de gramíneas de *Bromus catharticus*, *B. biebersteinii*, *Paspalum dilatatum* y *P. notatum* presentan asociaciones con hongos endófitos.
2. Las especies gramíneas *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum* de la zona estudiada no presentaron asociación simbiótica con hongos endófitos.
3. El género *Acremonium* es un género fúngico cosmopolita distribuido en gramíneas tropicales, como *Paspalum dilatatum* y *P. notatum*, y en gramíneas de zonas templadas, como *Bromus catharticus* y *B. biebersteinii*. Este género presenta cualidades para el control biológico de patógenos fúngicos en gramíneas y para la producción de metabolitos bioactivos de interés industrial, medicinal y biotecnológico.
4. Este estudio sugiere que existe un número significativo de especies fúngicas asociadas a pasturas nativas y adaptadas de la región sur de la provincia de Santa Fe, las cuales pueden desempeñar diversos roles ecológicos en su asociación simbiótica. Pueden comportarse como saprófitos, patógenos latentes, o como hongos con potencial antagonista y productores de micotoxinas y compuestos biológicamente activos. Siendo las especies pasturas *P. dilatatum*, *P. notatum*, *B. biebersteinii* y *B. catharticus*, importantes reservorios de diversidad endofítica, resulta relevante la conservación a nivel regional y nacional de las especies de

gramíneas estudiadas, en particular, las especies *Paspalum dilatatum* y *Bromus catharticus*.

5. Las cepas endófitas del género *Acremonium* spp. podrían ser buenos candidatos para el control biológico de especies patógenas de pasturas como *Alternaria alternata*, *Alternaria* sp., *Curvularia clavata* y *C. pallescens*. Sin embargo, el efecto antibiótico encontrado varió de forma especie-específica. Por este motivo, futuros estudios *in planta* complementarían estos resultados y permitiría comprender con mayor detalle el mecanismo involucrado en el efecto antagónico de las cepas estudiadas.
6. Este proyecto ha permitido ampliar el conocimiento sobre las especies fúngicas asociadas a las especies vegetales estudiadas, aportando al listado de especies endófitas asociadas a las especies de gramíneas en Argentina. En particular, en lo que respecta a las posibles aplicaciones de las especies del género *Acremonium*.
7. Doce morfoespecies aisladas no han podido ser identificadas por análisis morfológicos, por lo que no fue posible incluirlas dentro de las especies endófitas descritas. Este hecho sugiere que estas morfoespecies pueden aportar al listado de especies endófitas no reportadas asociadas a gramíneas para la región y el país. Será necesario un estudio posterior a nivel molecular para su caracterización y correcta identificación, así como para confirmar la clasificación de las especies de los géneros endófitos descritos mediante estudios morfológicos.
8. Los resultados obtenidos con este estudio, resaltan el gran potencial de las especies endófitas aisladas. Las mismas representan nuevos recursos para estudios que permitan obtener más información sobre dicho potencial. Esta caracterización involucra: i) estudios a nivel molecular y bioquímico sobre los extractos fúngicos obtenidos, ii) identificar los mecanismos implicados en la interacción planta-hongo endófito de las especies estudiadas, y iii) estudios *in planta* de las cepas de *Acremonium* aisladas con potencial antagónico.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Altieri M and Nicholls C (1999). Biodiversity and pest Management in Agroecosystems, Haworth Press, USA. 256pp.
2. Arenas R (1993). Micología medica ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica. McGraw Hill. México. 397pp.
3. Arias GG, Mesa L, Novo Z, Vilardel G, Manes D, Areces, Granda A, Gutiérrez RG, González FL, Zayas A, Ramos A, González M, Guardado M, Guevara I, Albanés C, Rivero G, Sánchez C, Buchillón C, López M (2006). Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. Fitosanidad, 10: 11-18.
4. Ault A (1998). Techniques and Experiments for Organic Chemistry. University Science Books. USA. 672pp.
5. Backman PA and Sikora RA (2008). Endophytes: An Emerging Tool for Biological Control, Biological Control, 46: 1–3. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.03.009.
6. Bacon CW (1985). A chemically defined medium for the growth and synthesis of ergot alkaloids by species of *balansia*. Mycologia, 77: 418-423.
7. Bacon CW and White JF (1994). Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC press. USA. 212pp.
8. Baker KF (1987). Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 25: 67-85.
9. Barnett HL and Hunter BB (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, APS Press. 218pp.

10. Baynes A, Russell M, Newcombe D, Carta G, Rossman L, Ismaiel D (2012). A mutualistic interaction between a fungivorous nematode and a fungus within the endophytic community of *Bromus tectorum*. *Fungal Ecology*, 5: 610 – 623.
11. Benavente C, Karina M, Lugo M (2008). Micofilas, endófitos fúngicos y alcaloides en poblaciones de *Melica stuckertii* (Poaceae) del Centro de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 43: 3-4.
12. Bertín OD (2009). Diagnóstico y Prospectivas de los Forrajes y Pasturas En Argentina. *Producir XXI*, 211: 16-20.
13. Blackwell M (2011). The Fungi: 1,2,3.....5.1 Million species?. *American journal of Botany*, 3: 426- 438.
14. Blumenthal C (2003). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39: 214–228.
15. Broberg A, Pohanka A, Sjogren J, Kenne C (2004). Screening, isolation and identification of metabolites from microorganisms with antifungal activity. Workshop on Semiochemicals and microbial antagonists: their role in integrated pest management in Latin America. Turrialba - Costa Rica. (March 22-26). 135pp.
16. Bush LP, Wilkinson HH, Schardl CL (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, 114: 1–7.
17. Bugs.bio, Fungal Biology (2013):
URL:http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/CAL/Microconcepts/Diversity/fungal_key.html. (Consultado octubre 2013).
18. Burkart A (1969). Parte II: Gramíneas. Flora ilustrada de entre Ríos. VI. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 551pp.

19. Cabrera AL (1970). Gramíneas. Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 624pp.
20. Cañedo V y Ames V (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Perú. 62pp.
21. Carmichael JW, Kendrick WB, Connors IL, Sigler L (1980). Genera of Hyphomycetes. Edmonton, The University of Alberta Press. USA. 468pp.
22. CBS.Knaw Fungal Biodiversity Centre. (2014):
URL:<http://www.cbs.knaw.nl/databases/anateleo.htm>. (Consultado enero 2014).
23. Chaparro A (2010). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa Nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Trabajo de grado, Magister en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, departamento de Química, GIBUJ. Colombia. 97pp.
24. Chiossone G (2011). Pastizales Naturales de Argentina. Pregón Agropecuario, INTA:
URL:<http://www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=2027#OMMAtrmMog1fM3DM.99> (Consultado diciembre 2014).
25. Christensen M, Leuchtmann JA, Rowan DD, Tapper BA (1993). Taxonomy of Acremonium endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial rye-grass (*Lolium perenne*). Mycological Research, 97: 1083–1092.
26. Carroll GC (1995). Forest Endophytes: Pattern and Process. Canadian Journal of Botany, 73: 1316-1324.
27. CIAT (1998). Annual Report Project IP-5. Tropical Grasses and Legumes: Optimizing Genetic Diversity for Multipurpose Use. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia, 5: 44-58.

28. Cina R, Iannone L, Proplame-Prhideb-CONICET (2010). Endófitos Epichloë en Gramíneas Nativas de Selvas del Norte Argentino. I Congreso Latinoamericano (IV Argentino) de Conservación de la Biodiversidad. Argentina. (Noviembre 22-26). 88pp.
29. Clarck EM, White JF, Patterson M (1983). Improved histochemical technique for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of in vitro culture of fungus. *Journal of Microbiological Methods*, 1: 149-155.
30. Clay K (1989). Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. *Mycological Research*, 92: 1-12.
31. Clay K (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology*, 21: 275-297.
32. Clay K (1991). Endophytes as Antagonists of Plant Pests. In: John HA and Hirano, SS. (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Series in Contemporary Bioscience, 331-357. USA. 499pp.
33. Clay K (1998). Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: Cheplick GP. (Eds.), *Population Biology of Grasses*, Cambridge University Press, Cambridge. 255-285. USA. 412pp.
34. Clay K and Schardl C (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 100: 100-127.
35. Clayton WD, Vorontsova MS, Harman KT, Williamson H (2002). World Grass Species: Descriptions, Identification, and Information Retrieval. URL: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. (Consultado noviembre 2010)
36. Clayton WD, Harman KT, Williamson H (2006). GrassBase - The Online World Grass Flora. URL: <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. (Consultado junio 2011).

37. Clement B (2002). Organic Chemistry Laboratory Manual, Texas A&M University, USA. 146pp.
38. Combés A, Ndoye I, Bance C, Bruzard J, Djediat C (2012). Chemical Communication between the Endophytic Fungus *Paraconiothyrium Variabile* and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. Plos One, 10: e47313. doi:10.1371/journal.pone.0047313
39. Craven KD, Blankenship JD, Leuchtmann A, Hignight K, Schardl CL (2001). Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass *Lolium pratense*. Sydowia, 53: 44-73.
40. De Bary A (1866). Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany. Germany. 331pp.
41. Delgado A and Alonso O (1994). Las enfermedades fungosas en los pastos tropicales. Pastos y Forrajes, 17: 89-93.
42. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar> (Consultado abril 2012).
43. Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press, USA. 893pp.
44. Droby S, Chalutz E, Cohen L, Weiss B, Wilson C, Wisniewski M (1990). Nutrient competition as a mode of action of post-harvest biocontrol agents. In: Wilson C. and Chalutz E. (Eds.), Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables, workshop proceedings. Shepherdstown, West Virginia. USA. 142 -160.
45. Ellis MB (1971). Dematiaceous Hyphomycetes, CMI, Kew, Surrey. UK. 608pp.
46. FCAgr (2013). Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. URL: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/CampoExperimental/parque.html> (Consultado junio 2013).

47. Feldman TS and O'Brien HE (2008). Moths that Vector a Plant Pathogen also Transport Endophytic Fungi and Mycoparasitic Antagonists. *Microbial Ecology*, 56: 742–750.
48. Fokkema NJ (1978). Fungal antagonism in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89: 115-117.
49. Foster R, McKay H, Owens E (1996). Regar Brome grass. University of Idaho Agricultural Experiment Station Bulletin. Russia. 470pp.
50. Gallagher RT, White EP, Mortimer PH (1981). Ryegrass staggers: isolation of potent neurotoxins lolitrem A and lolitrem B from staggersproducing pastures. *New Zealand Veterinary Journal*, 29: 189–190.
51. Gallagher RT, Hawkes AD, Steyn PS, Vleggaar R (1984). Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock: structure elucidation of lolitrem *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 9: 614–616.
52. Gamboa MA, Wen S, Fetcher N, Bayman P. 2005. Effects of fungicides on endophytic fungi and photosynthesis in seedlings of a tropical tree, *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Acta biológica colombiana*, 10: 41-47.
53. Gamboa M (2006). Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento Actual Y Perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11: 3-20.
54. Gams W, Diederich P, Poldmaa K (2004). Fungicolous fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds.), *Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods*. Elsevier. USA. 343–392.
55. García M, Arturi MJ, Ansín OE (2001). Potencial de mejora en caracteres cuantitativos de *Paspalum dilatatum* Poir. en poblaciones del noreste bonaerense. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata- Argentina*, 2: 104-105.

56. Gentile A, Rossi MS, Cabral D, Craven, Schardl KL (2005). Origin, divergence, and phylogeny of epichloë endophytes of native Argentine grasses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 196–208.
57. Gundel PE, Perez LI, Helander M, Saikkonen K (2013). Symbiotically modified organisms: nontoxic fungal endophytes in grasses. TRPLSC-1049, *Trends in Plant Science*, 18: 420-427. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.003>
58. Gwinn KD and Gavin AM (1992). Relationship between endophyte infestation level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zeae* seedling disease. *Plant disease*, 76: 911-914.
59. Hahn H, McManus MT, Warnstorff K, Monahan BJ, Young CA, Davies E, Tapper BA, Scott B (2007). Neotyphodium fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit, *Environmental and Experimental Botany*, 63: 183-199. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.10.021.
60. Hernández CJ (1970). *Bromus*. En: Flora de la Provincia de Buenos Aires. Tomo IV, Parte II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Colección Científica. Buenos Aires, Argentina. 555pp.
61. Heuvel J Van Den (1971). Antagonism between pathogenic and saprophytic *Alternaria* species on bean leaves. In: Preece TF and Dickinson CH (Eds.), *Ecology of Leaf Surface Microorganisms*, Academic Press. England. 537-544.
62. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PM, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous P, Dai Y, Gams W, Geiser D, Griffith G, Gueidan C, Hawksworth D, Hestmark G, Hosaka K, Humber R, Hyde K, Ironside JE, Koljalg J, Kurtzman C, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Dlikowska MJ, Miller A, Moncalvo J, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers J, Roux C,

- Ryvarden L, Sampaio J, Schußler A, Sugiyama J, Thorn G, Tibelz L, Untereiner W, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White M, Winka K, Yao Y, Zhang N (2007). A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547.
63. Iannone LJ and Cabral D (2006). Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. *SYMBIOSIS*, 41: 61–69.
64. Iannone LJ, White JF, Giussani LM, Cabral D, Novas MV (2011). Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological Progress*. 10: 9–19.
65. Iannone LJ, Novas M, Young C, De Battista J, Schardl CL (2012). Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. *Fungal Ecology*, 5: 357-363.
66. Johnson M, Dahlman D, Siegel M, Bush L, Latch G, Potter D, Varney D (1985). Insect Feeding Deterrents in Endophyte-Infected Tall Fescue. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 568-571.
67. Khidir HH, Eudy DM, Porrás Alfaro A, Herrera J, Natvig D, Sinsabaugh RL (2010). A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environments*, 74: 35-42.
68. Kobayashi DY and Columbo JD (2001). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW and White JF Jr. (Eds.), *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, USA. 487pp.
69. Krcmery VJr, Fuchsberger P, Trupl J, Blahova M, Danisovicova A, Svec J, Drgona L (1993). Fungal pathogens in etiology of septic shock in neutropenic patients with cancer. *Zentralbl Bakteriologie*, 278: 562–565.

70. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19: 792-798. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>.
71. Lamb R and Brown F (1970). Non-Parasitic Microflora on Leaf Surfaces of *Paspalum Dilatatum*, *Salix Babylonica* And *Eucalyptus Stellulata*. *Transactions of the British Mycological Society*, 3: 383-390.
72. Leuchtman A (1992). Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins*, 1: 150–162.
73. Leyronas C and Raynal G (2001). Presence of Neotyphodium- like endophytes in European grasses. *Annals of Applied Biology*, 139: 119–127.
74. Lischinsky LH, Uzal FA, Alvarez A, Scaraffia L, Robles CA, Ayesa JA (1990). Detección de Hongos Endófitos en *Poa huecu* y *Festuca argentina*. *Memorias de la IV Reunión y Asamblea anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD)*. Argentina. 74pp.
75. Lodge D, Fisher P, Sutton B (1996). Endophytic Fungi of *Manilkara bidentata* Leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, 88: 733-738.
76. Lowell P, Bush H, Wilkinson H, Schardl C (1997). Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte symbioses. *Plant Physiology*, 114: 1-7.
77. Madia M and Schrauf G (1999). Prospección de enfermedades de Pasto Miel (*Paspalum dilatatum* Poir) detectadas en la Región Pampeana de la República Argentina. *Boletín de sanidad vegetal- Plagas*, 25: 435-443.
78. Mc Darby (2013). URL: <http://faculty.fmcc.suny.edu/mcdarby/Pages/ClassificationKey/ClassificationMonera-Fungi.htm>. (Consultado junio 2013).
79. Massbank (2013). URL: <http://www.massbank.jp/> (Consultado agosto 2013).

80. Medvescigh JC (2004). Germinación de semillas y crecimiento de plantas de *Lolium multiflorum* Lam. Infechadas con *Neotyphodium occulans* (Moon, Scott et Christensen) Evaluadas en diferentes condiciones hídricas. Tesis de Magister en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Córdoba. Argentina. 70pp.
81. Mejía L, Rojas E, Maynard Z, Van Bael S, Arnold E, Hebbar P, Samuels G, Robbins N, Herre E (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46: 4-14.
82. Mishra RR and Tewari RP (1976). Studies on biological control of *Puccinia graminis* tritici. In: Dickinson CH and Preece TF (Eds.), *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Academic Press. England. 559-567.
83. Munday-Finch SC, Miles CO, Wilkins AL, Hawkes AD (1995). Isolation and structure elucidation of lolitrem A, a tremorgenic mycotoxin from perennial ryegrass infected with *Acremonium lolii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1283–1288.
84. Mycobank (2012). URL: <http://www.mycobank.org/>. (Consultado enero 2012).
85. Narayanasamy P (2013). Mechanisms of Action of Fungal Biological Control Agents. *Biological Management of Diseases of Crops. Progress in Biological Control*, 15: 99-200.
86. Paranagama PA, Wijeratne EMK, Gunatilaka AAL (2007). Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. *Journal of Natural Products- American Chemical Society*, 70: 1939–1945.
87. Pitson SM, Seviour RJ, Mcdougall BM (1997). Production of b-glucan degrading enzymes by *Acremonium* and *Cephalosporium* species. *Mycological Research*, 2: 153-158.

88. O'Hanlon KA, Knorr K, Jørgensen LN, Boelt MNB (2012). Exploring the potential of symbiotic fungal endophytes in cereal disease suppression. *Biological Control*, 63: 69-78. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.007>
89. Ogle D, St John L, Holzworth L, Jensen K, Tilley (2012). Plant Guide for Meadow Brome (*Bromus biebersteinii*). USDA-Natural Resources Conservation Service, Aberdeen Plant Materials Center. USA. 210pp.
90. Okeke B, Murandi FS, Steiman R, Buarque N (1994). Fungal metabolite extracts active against phytopathogens. *The Science of the Total Environment*, 155: 125-130.
91. Omacini M, Semmartin M, Pérez LI, Gundel PE (2011). Grass–endophyte symbiosis: A neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology*, 61: 273-279. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.012
92. Parish JA, McCann MA, Watson RH, Hoveland CS, Hawkins LL, Hill NS, Bouton J H (2003). Use of nonergot alkaloid-producing endophytes for alleviating tall fescue toxicosis in sheep. *Journal of Animal Science*, 81: 1316–1322.
93. Parra DC (2006). Selección de Extractos Fúngicos Extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinérea* en tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*). Tesis de grado, Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Bogota- Colombia. 114pp.
94. Petrini O, Petrini L, Rodrigues K (1995). Xylariaceous endophytes: An Exercise in Biodiversity. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 531-539.
95. Porrás Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh RL, Odenbach KJ, Lowrey T, Natvig DO. (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2805-2813.

96. Redlin S and Carris L (1996). Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, Ecology and Evolution. APS Press, USA. 223pp.
97. Rodrigues K and Petrini O (1997). Biodiversity of Endophytic Fungi. In: Hyde Kd (Eds.), Biodiversity of Tropical Microfungi. Tropical Regions. China: Hong Kong University Press. 57-69.
98. Rojas C, Galdames R, Romero O (1995). Efecto del Hongo Endófito de la Festuca (*Acremonium coenophialum* Morgan Jones & Gams) sobre la ganancia de peso en novillos a pastoreo. Agricultura Técnica, 55: 134-139.
99. Rowan DD, Hunt MB, Gaynor DL (1986). Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 12: 935–936.
100. Saikkonen K, Faeth S, Helander M, Sullivan T (1998). Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 29: 319- 343.
101. Saikkonen K, Ahlholm J, Helander M, Lehtimäki S, Neimeläinen O (2000). Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. Ecography, 23: 360–366.
102. Saikkonen K, Ruokolainen K, Huitu O, Gundel PE, Piltti T, Hamilton CE, Marjo Helander M (2013). Fungal endophytes help prevent weed invasions. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1651-1655. doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2012.12.002>
103. Salgado C and Cepero MC (2005). Aislamiento de hongos endófitos en Rosa (*Rosa hybrida*) en Bogota, Colombia. Revista Iberoamericana de Micología, 22: 99-101.
104. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (2005). Introduction to food and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures - Utrecht, The Netherlands. 389pp.

105. Sánchez-Márquez S, Bills GF, Zabalgoceazcoa I (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, 27: 171-195.
106. Sánchez-Márquez S, Bills GF, Zabalgoceazcoa I (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity*, 33: 87-100.
107. Sánchez-Márquez S, Bills G, Herrero N, Zabalgoceazcoa I (2012). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5: 289 -297.
108. Schardl CL (1996). *Epichloë* species: Fungal symbionts of grasses. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 109–130.
109. Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315–340.
110. Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K (2013). Plant Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the Clavicipitaceae Reveals Dynamics of Alkaloid Loci. *PLoS Genetics*, 9: e1003323. doi:10.1371/journal.pgen.1003323
111. Schell WA and Perfect JR (1996). Fatal disseminated *Acremonium strictum* infection in a neutropenic host. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1333–1336.
112. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K (2002). Review: Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106: 996-1004.
113. Schulz B and Boyle C (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 10: 661-686.
114. Scott B (2004). Functional Analysis of the Perennial Ryegrass –*Epichloë* Endophyte Interaction. In: Hopkins A, Wang ZY, Mian R, Sledge M, Barker RE, (Eds.), *Molecular Breeding of Forage and Turf*. NZ. 133-144.

115. Senyuva H and Gilbert J (2007). Rapid Analysis of Crude Fungal Extracts for Secondary Metabolites by LC/TOF-MS, A New Approach to Fungal Characterization. © Agilent Technologies, Inc. 5989-6820EN.
116. Shew HD and Lucas GB (1991). Compendium of Tobacco Diseases, American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, 1: 115-117.
117. Shimanuki T (1987). Studies on the mechanisms of the infection of timothy with purple spot disease caused by *Cladosporium phlei* (Gregory) de Vries. Hokkaido National Agricultural Experiment Station Series Bulletin. NZ. 148pp.
118. Siegel MR, Latch GCM, Bush LP, Fannin FF, Rowan DD, Tapper BA, Bacon CW, Johnson MC (1990). Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 3301-3315.
119. Skidmore AM and Dickinson CH (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septena nodurum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 57-64.
120. Schimmel T, Coffman A, Parsons S (1998). Effect of Butyrolactone I on the producing Fungus, *Aspergillus terreus*. *Applied and environmental Microbiology*, 64: 3703-3712.
121. Soreng RJ, Peterson PN, Davidse G, Judziewicz EJ, Zuloaga FO, Filgueiras TS, Morrone O (2003). Catalogue of New World Grasses (Poaceae): IV subfamily Pooideae. *Contributions from the United States National Herbarium*. 730pp.
122. Stone JK, Polishook JD, White Jr. JF (2004). Endophytic fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds.), *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, USA, 241-270.

123. Strobel G, Torczynski R, Bollon A (1997). *Acremonium* sp. a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, 128: 97–108.
124. Sumarah M, Miller D, Adams G (2005). Measurement of a rugulosin-producing endophyte in white spruce seedlings. *Mycologia*, 97: 770–776.
125. Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoog, Starink M, Arocha Y, Guarro J, Scott JA (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68: 139–162.
126. Sutton BC (1980). *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, 696pp.
127. Tan R and Zou W (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *The Royal Society of Chemistry*, 18: 448-459.
128. Tagne AM, Neergaard E, Hansen HJ (2002). Studies of host-pathogen interaction between maize and *Acremonium strictum* from Cameroon. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 93–102.
129. USDA ARS (2013). National Genetic Resources Program. GRIN. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?26843> (Consultado febrero 2013).
130. Ulloa M and Hanlin RT (2000). *Illustrated dictionary of mycology*. St. Paul, APS Press. USA. 448pp.
131. Vaz A, Mota R, Bomfim M, Vieira M, Zani C, Rosa CA, Rosa L (2009). Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 1381–1391. doi: 10.1139/W09-101.

132. Vignale MV, Astiz-Gassó MM, Novas MV, Iannone LJ (2013). Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). *Biological Control*, 67: 1–7.
133. Von Arx JA (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. Vaduz J Cramer 1970. USA. 288pp.
<http://books.google.com.co/books?id=WMTQAAAAMAAJ> (Consultado mayo 2013).
134. Walsh JL, Laurence MH, Liew E, Sangalang AE, Burgess LW, Summerell BA, Petrovic T (2010). Fusarium: two Endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity*, 44: 149-159.
135. Warris A, Wesenberg F, Gaustad P, Verweij PE, Abrahamsen TG (2000). *Acremonium strictum* fungaemia in a paediatric patient with acute leukaemia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 32: 442–444.
136. Weis AE and Berenbaum MR (1989). Herbivorous insects and green plants. In: Abrahamson WG (Eds.), *Plant-animal interactions*. McGraw-Hill. USA. 123-162.
137. Whipps J and McQuilken M (1993). Aspects of biocontrol of fungal plant pathogens. In: Jones DG (Eds.), *Exploitation of Microorganisms*, Chapman & Hall. England. 45-79.
138. White JF and Cole GT (1985). Endophyte-host associations in forage grasses. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. *Mycologia*, 77: 323–327.
139. White JF and Cole GT (1986). Endophyte-host associations in forage grasses. V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. *Mycologia*, 78: 846–850.
140. White JF (1988). Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia*, 80: 442-446.

141. White JF and Baldwin NA (1992). A preliminary enumeration of grass endophytes in west central Europe grasslands. *Sydowia*, 44: 78–84.
142. White IR and Backhouse D (2007). Comparison of fungal endophyte communities in the invasive panicoid grass *Hyparrhenia hirta* and the native grass *Botriochloa macra*. *Australian Journal of Botany*, 55: 178-185.
143. Whittaker RJ, Willis K, Field R (2001). Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography*, 28: 453-470.
144. Wicklow D, Roth S, Deyrup S, Gloer J (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109: 610–618. doi:10.1017/S0953756205002820
145. Wilson LC, Wisniewski EM, Biles LC, McLaughlin R, Chalutz E, Droby S (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection*, 10: 172-177.
146. Wong MKM and Hyde KD (2001). Diversity of fungi on six species of Gramineae and one species of Cyperaceae in Hong Kong. *Mycological Research*, 105: 1485-1491.
147. Young CA, Bryant MK, Christensen MJ, Tapper BA, Bryan GT, Scott B (2005). Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Molecular Genetics and Genomics*, 274: 13–29.
148. Young CA., Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B (2006). A complex gene cluster for indolediterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 679–693.
149. Zhang H, Tomoda H, Tabat N, Miura H, Namikoshi M, Yamaguchi Y, Masuma R, Omura S (2001). Cladospolide D, a new 12- membered macrolide antibiotic produced by *Cladosporium* sp. FT -0012. *The Journal of Antibiotics*, 54: 635- 641.

150. Živković S, Stojanović S, Ivanović Ž, Gavrilović V, Popović T, Balaž J (2010). Screening of Antagonistic Activity of Microorganisms Against *Colletotrichum Acutatum* And *Colletotrichum Gloeosporioides*. Archives of Biological Science Belgrade, 62: 611-623.

151. Zuloaga FO and Morrone O (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. USA. 297pp.

10. ANEXOS.

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo líquido para la obtención de micelio y extractos fúngicos.

1.1. Medio líquido M102 (Protocolo de Bacon y White, 1994).

Este medio líquido permite la esporulación y el crecimiento adecuado de hongos endófitos, para obtención de micelio y conservación de material fúngico por tiempos prolongados.

Materiales.

Sacarosa.....	30g
Extracto de malta.....	20g
Peptona bacteriológica.....	2g
Extracto de levadura.....	1g
KCl.....	0,5g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,5g
Agua destilada.....	1000ml

Los endófitos pueden ser inoculados en este medio y crecidos bajo agitación y pueden ser almacenados como cultivos estacionarios durante aproximadamente 6 meses. Para almacenamiento se debe sellar con plástico para evitar evaporación.

Observaciones: los cultivos de hongos endófitos obtenidos en este medio se pueden filtrar con una gasa estéril y secar en estufa a 50°C para almacenamiento del micelio. También se puede obtener el micelio mediante la separación de líquido por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min con temperatura de 8°C.

1.2. Medio líquido SM (Protocolo de Bacon y White, 1994).

Dado que este medio de cultivo contiene factores de crecimiento, los hongos crecen rápidamente. Es utilizado para inducir la producción de metabolitos bioactivos.

Materiales.

Sorbitol.....	100g
Glucosa.....	40g
Acido succínico.....	10g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0.3g
Extracto de levadura.....	1g
Tiamina- HCL.....	1 g
Ácido nicotínico.....	0.14mg
Pyrridoxina.....	0.2 mg
DL-Triptofano.....	0.8g
Elementos traza (solución)*.....	5ml
Agua destilada.....	1000ml

Los endófitos pueden crecer en este medio utilizando como inóculo un pequeño volumen (1 ml) de cultivo obtenido en el medio M102.

*Para la preparación de la solución de elementos traza 1000mg/100ml: Ácido cítrico, 50mg; Fe (NH₄)₂(SO₄)₂. 6H₂O, 100mg; ZnSO₄. 7H₂O, 50mg; MnSO₄. H₂O, 0.05mg; NaMoO₄. 2H₂O, 0.05mg; CuSO₄. 5H₂O (pH 5,6).

Referencia: Bacon C and White J (1994). Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses. CRC Press. USA. 212pp.

Anexo 2. Descripción taxonómica y morfológica de las especies de hongos endófitos y patógenos aislados.

Género: *Acremonium*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Sordariomycetes

Familia: Hypocreomycetidae

Incertade sedis.

***Acremonium* spp.:** Las características morfológicas más sobresalientes son hifas septadas, fíalides delgadas producidas en grupos o individuales, la conidia tiende a ser unicelular, producida en cabezas mucoides con cadenas no conectadas, los conidios pueden ser hialinos o melanizados pero las hifas generalmente son hialinas. Son hongos de lento crecimiento con micelio aéreo algodonoso o aterciopelado que en ocasiones tiende a verse muy húmedo, con coloración blanquecina a rosa pálido y naranja. Al anverso las coloraciones van desde rosa, pardo, ocre y tiende a oscurecerse en los cultivos más viejos (Summerbell *et al.*, 2011).

1. *Acremonium strictum* (W. Gams), (nueva clasificación: *Sarocladium strictum*). Cepas 039 y 052.

Características macroscópicas: Colonias de rápido crecimiento en medio agar PDA, de aspecto húmedo a viscoso, de color blanco, rosa o naranja claro, el reverso es de color rosa a naranja o incoloro. Las colonias alcanzan los 2,5 cm de diámetro en 10 días a 20°C.

Características microscópicas: conidióforos simples, ocasionalmente ramificados, fíalides delgadas, hifas sumergidas y fasciculadas, conidióforos agrupados en cabezas viscosas, cilíndricas a elipsoidales, hialinas, pocos caracteres diferenciales, no forma clamidiosporas o esclerocios.

A.



B.



Figura 1. *Acremonium strictum*, A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

2. *Acremonium* sp.1 Cepas: 030, 032 y 057:

Características macroscópicas: Colonias de textura algodonosa, con el centro elevado, bordes con textura lisa, color blanco/rosa pálido, reverso color crema, liso, 2,5-3 cm de diámetro a los 8 días de cultivo, crecimiento lento, sin exudado.

Características microscópicas: hifas tabicadas, hialinas, delgadas de pared lisa, se evidencia material celular en el interior como pequeñas granulaciones en tinción de Azul de Metileno, conidia unicelular, solitaria o agrupada en cabezas mucoides, conidia esférica, diminuta a 100x, pared lisa, hialina.

A.



B.



Figura 2. *Acremonium* sp.1 A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

3. *Acremonium* sp.2 *Aff. kiliense* (Grütz) (nueva clasificación: *Sarocladium kiliense*).
Cepa 064.

Características macroscópicas: Las colonias alcanzan los 35-40 mm de diámetro luego de 12 días en medio de cultivo. El color del micelio varía dependiendo del medio de cultivo utilizado. En medio PDA el micelio es poco elevado y varía de un color blanco a salmón y en el anverso es de color salmón. Después de un mes de cultivo el color en el anverso se vuelve más intenso cambiando de color ocre a marrón.

Características microscópicas: Las hifas son de paredes delgadas, hialinas entre 0,5-1,5 μm de ancho, presenta células conidiogenas filídicas solitarias, ocasionalmente en conidióforos ramificados de 30-60 μm de largo por 1,5-2 μm de ancho en la base estrechándose hasta 0,5-1 μm en el ápice, las fíalides son cortas, sin septo basal, se forman en cultivos sumergidos de agar, los conidios son producidos individualmente, en las puntas de las fíalides y se agregan en cabezas viscosas, elipsoidales a cilíndricas, de rectas a ligeramente curvadas, clamidiosporas intercalares o terminales, separadas y ocasionalmente en cadenas cortas.

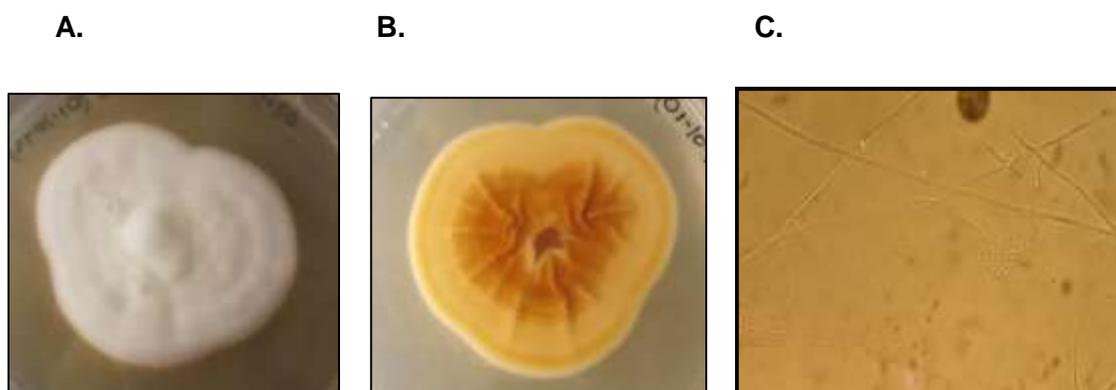


Figura 3. *Acremonium* sp.2, *aff. kiliense* (064). A y B. En medio agar PDA (8 días). C. Estructuras microscópicas (100x)

4. *Acremonium* sp.3 Cepa 033.

Características macroscópicas: Colonias de lento crecimiento, textura algodonosa superficial, bordes irregulares, color blanco, reverso del mismo color y en cultivos viejos tiende a ser de color beige con algunas líneas de color café claro, 1,5-2,5 cm de diámetro a los 7 días de cultivo, sin exudado.

Características microscópicas: hifas hialinas, delgadas de pared lisa, fálides cortas, terminaciones en punta, conidióforos agrupados no conectados, conidias abundantes, esféricas, diminutas, hialinas, pared lisa.

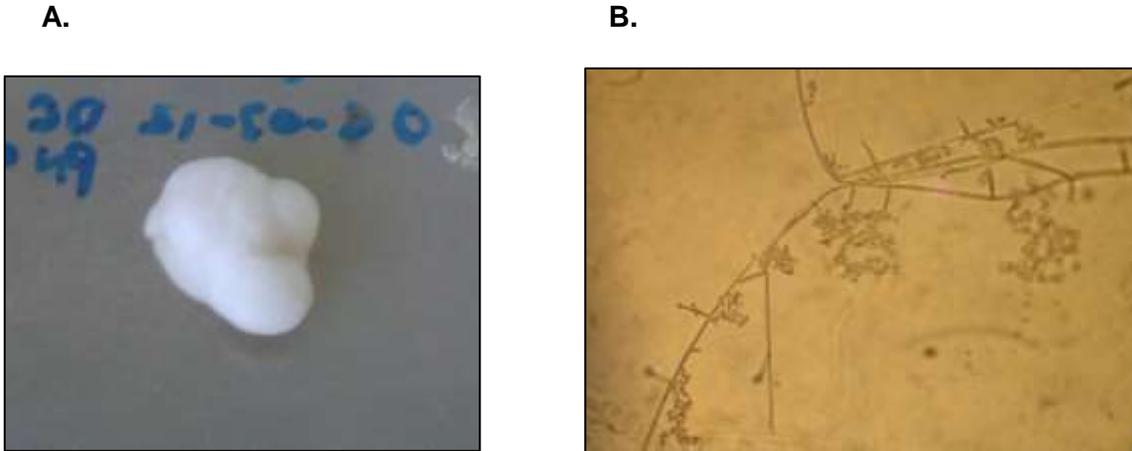


Figura 4. *Acremonium* sp.3 A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas(100x).

5. *Acremonium* sp.4 Cepas: 040 y 051.

Características macroscópicas: Colonias de lento crecimiento, textura vellosa, bordes irregulares, color blanco, reverso de color café claro, con arrugas se oscurece con el tiempo, 2-4 cm de diámetro a los 15 días de cultivo.

Características microscópicas: hifas hialinas, delgadas, pared lisa, fálides alargadas, delgadas, pared lisa, conidióforos agrupados no conectados, conidias abundantes, de ovoides a alargadas, hialinas, pared lisa, presenta exudado y cambio de color del medio PDA en presencia de otras cepas fúngicas en cultivos duales.

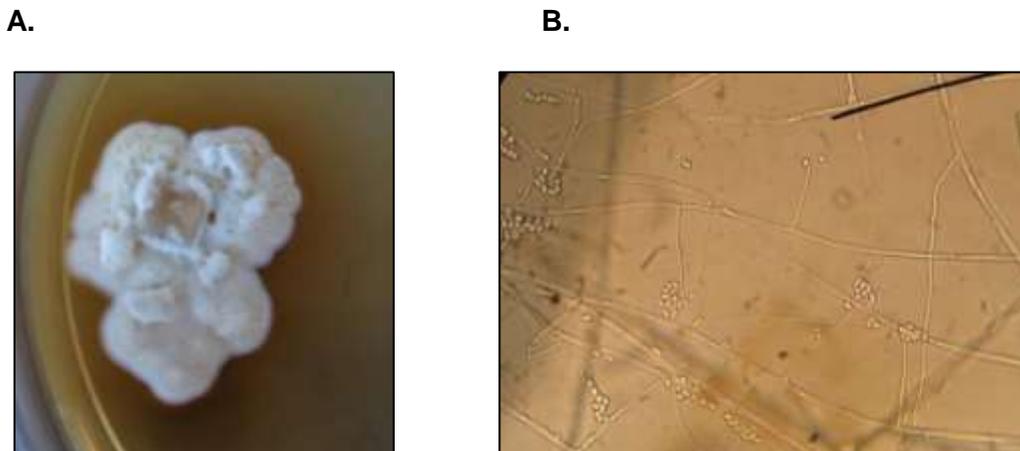


Figura 5. *Acremonium* sp.4 A. En medio agar PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

6. *Acremonium* sp.5 Cepas: 053, 056 y 058.

Características macroscópicas: Colonias de textura algodonosa, centro elevado, color blanco, reverso de color crema-beige, liso, 2,5-35 cm de diámetro a los 8 días de cultivo.

Características microscópicas: hifas hialinas, delgadas, pared lisa, fálides cortas, delgadas en la base gruesas, pared lisa, conidias solitarias o agrupadas, esféricas, hialinas, pared lisa, diminutas a 100x, formación de clamidiosporas, hifas simples no ramificadas.

A.



B.

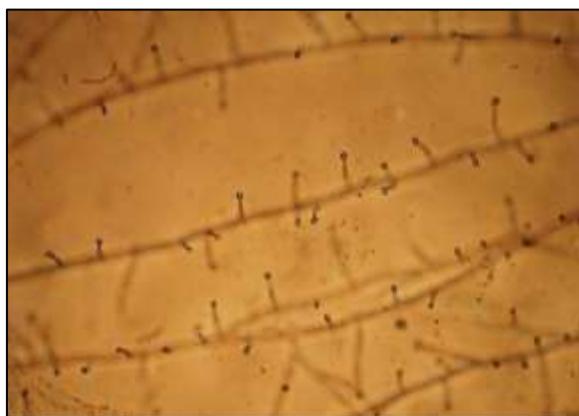


Figura 6. *Acremonium* sp.5 A. En medio agar PDA (14 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

7. *Acremonium* sp.6 Cepas: 054 y 073.

Características macroscópicas: Colonias irregulares de textura algodonosa, ramificado, micelio poco elevado, de color blanco, reverso del mismo color, apariencia húmeda, 8 cm de diámetro en 10 días de cultivo en medio PDA.

Características microscópicas: hifas hialinas, delgadas, pared lisa, conidióforos ramificados las fálides cortas, con septo basal, los conidios esféricos hialinos, agrupados en las puntas de las fálides y se agregan en cabezas viscosas cilíndricas, observación de clamidiosporas intercalares o terminales, separadas y ocasionalmente en cadenas cortas.

A.



B.



Figura 7. *Acremonium* sp.6 A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

8. *Acremonium* sp.7 Cepas: 074, 050 y 055.

Características macroscópicas: Colonias de textura vellosa, bordes irregulares, color blanco a crema, reverso de color café claro, liso, se oscurece con el tiempo, 3,5-5,0 cm de diámetro a los 10 días de cultivo.

Características microscópicas: hifas hialinas, delgadas, pared lisa, fíalides alargadas, delgadas, pared lisa, conidióforos agrupados, conidias de ovoides a alargadas, hialinas, pared lisa.

A.



B.



Figura 8. *Acremonium* sp.7 A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

Género: *Alternaria*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Alternaria spp.: Colonias efusas, generalmente de color gris, marrón o pardo oscuro. El micelio puede estar sumergido en el medio o tener alguna parte superficial, las hifas pueden ser incoloras, oliváceas, marrones. El estroma esta raramente formado, conidióforos macronematosos, mononematosos, simples o irregulares y poco ramificados, de color marrón pálido a marrón, solitarios o en fascículos, células conidiógenas integradas, con conidios con septos transversales y longitudinales conocidos como dictiosporas, de color pardo, originados por el brote apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote (Mycobank, 2012).

9. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, Cepa 046.

Características macroscópicas: colonias de rápido crecimiento (3 a 4 días), vellosas, de color gris al inicio, oscureciéndose con el tiempo adquiriendo coloraciones que van del pardo al negro, más oscuras al centro de la colonia con bordes más claros, reverso de color negro a grisáceo, las colonias alcanzan 4,5cm de diámetro en medio PDA, de apariencia algodonosa.

Características microscópicas: conidióforos simples, tabicados, en el extremo conidios muriformes de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular, generación de nuevos conidios por germinación de la célula apical, formándose largas cadenas de 10 o más conidios.

A.



B.

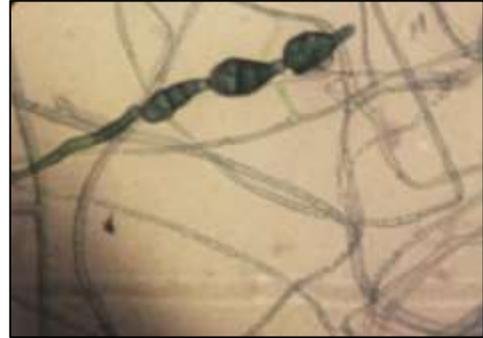


Figura 9. *Alternaria alternata* (046). A. En medio agar PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x), observación de conidióforos y conidios en cadena.

10. *Alternaria raphani* (J.W. Groves & Skolko). Cepa 001.

Características macroscópicas: micelio poco elevado, ramificado, de aspecto poroso-granulado, de color pardo-grisáceo, colonias de 2,5-3cm de diámetro, rápido crecimiento (5 días), reverso pardo-oscuro.

Características microscópicas: conidióforos simples y ocasionalmente ramificados, septados, de color oliváceo-café, de hasta 150 μ m de longitud y de 3-7 μ m de espesor, algunas veces hinchados ligeramente en la punta, y usualmente con un poro germinal. La conidia generalmente en cadenas de 2-3, derecha o ligeramente curva, de ovalada a elipsoidal, de dorada oscuro a oliváceo-café, suave o pocas granulaciones, presenta de 3-7 septos transversales, de 50-130 (70) μ m de ancho en la parte más amplia. Clamidosporas formadas abundantemente en cultivos, en ocasiones en cadenas al principio uniceluladas redondas y finalmente multicelular e irregulares, de color café, los conidióforos a menudo se desarrollan de estas clamidosporas.

A.



B.

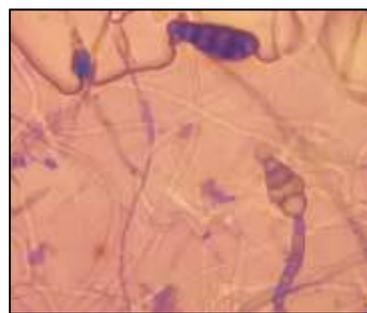


Figura 10. *Alternaria raphani* (001). A. En medio agar PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

11. *Alternaria brassicicola* (Schwein) Wiltshire. Cepas: 010 y 019.

Características macroscópicas: micelio de color marrón-pardo intenso poco elevado, granuloso y ramificado a los bordes. Rápido crecimiento, sin producción de exudados, colonias alcanzan los 5-7 cm de diámetro en medio PDA.

Características microscópicas: Conidios entre cortos, amplios- ovoides, de 35-40 x 18-20 micras, los cuales tienen de 3 a 4 septos transversales, dos de los cuales son ligeramente estrechos alrededor de un segmento transversal central amplio característico que contiene un solo longisepto. El color de los conidios en aislamientos típicos siempre es oscuro con tonalidades de color marrón oscuro, que son particularmente más evidentes en las paredes y septos.

A.



B.

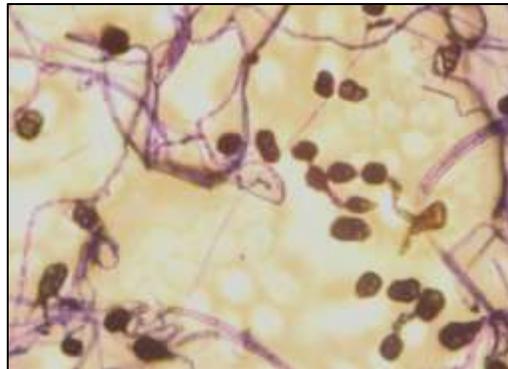


Figura 11. *Alternaria brassicicola*. A. En medio agar PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

12. *Alternaria* sp.1 Cepas: 013, 014, 031 y 035.

Características macroscópicas: colonias de aspecto afelpado, aterciopelado, poco elevado, sumergido, de color pardo, marrón oscuro, rápido crecimiento 5,5-7,5 cm de diámetro (7 días), aspecto húmedo, borde irregular, cambio de color del medio en medio PDA, reverso color café con tonalidades ocre y pardas.

Características microscópicas: hifas septadas, gruesas, pared gruesa, con tabiques, ramificadas, coloración olivácea, conidióforos macronematosos y mononematosos, color marrón, solitarios, con células conidógenas integradas, conidios de color oliváceo, con tres septos transversales y un septo longitudinal, no se observa poro apical o germinal, no se observan cadenas de dictiosporas.

A.



B.



Figura 12. *Alternaria* sp.1 A.En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

13. *Alternaria* sp.2, *aff. cheiranthi* (Lib.) P.C. Bolle. Cepa 018.

Características macroscópicas: colonias de rápido crecimiento 5-7cm de diámetro en 8 días en PDA. Color gris claro con bordes más oscuros, poco elevado, con micelio aéreo ramificado-algodonoso, reverso pardo- oscuro algunas arrugas.

Características microscópicas: los conidióforos surgen de manera simple o en grupos, generalmente simples pero algunas veces ramificados, derechos a ligeramente curvos, septados, color oliváceo pálido, a menudo hialinos al ápice, sin ornamentaciones o granulaciones, de 130 μm de longitud y 5-8 μm de ancho un poro terminal germinal simple al comienzo pero al final tienen a presentar 4 poros o cicatrices de germinación. Los conidios son generalmente solitarios, raramente en cadenas de 2,3 o más, de diversas formas, a menudo piriformes, ovoides o elongadas, generalmente redondeadas en la base, con numerosos septos transversales, longitudinales y oblicuos, de oliváceo claro a café dorado, translucidos, paredes internas oscuras, suaves con 20-100 μm de longitud y 13-32 μm de ancho en la parte más amplia.

A.



B.



Figura 13. *Alternaria* sp.2, *aff. cheiranthi* (018). A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

6. *Alternaria* sp.3 Cepas: 027 y 067.

Características macroscópicas: colonias de aspecto veloso, afelpado, sumergido, de color marrón rojizo, rápido crecimiento 5-8 cm de diámetro (10 días), borde con ramificaciones, reverso color café con tonalidades ocre y pardas.

Características microscópicas: hifas septadas, delgadas, lisas, con tabiques, ramificadas, coloración olivácea, conidióforos macronematosos y mononematosos, color oliváceo, células conidiógenas integradas, conidios de color oliváceo a marrón, con 3-4 septos transversales, en ocasiones un septo longitudinal al centro, el conidio presenta poro apical germinal.

A.



B.



Figura 14. *Alternaria* sp.3 A. En medio agar PDA (15 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

Género: *Aspergillus*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Aspergillus spp.: Colonias efusas de diversos colores, a menudo de color verde o amarillento, a veces de color marrón o negro. El micelio de aspecto polvoso, de rápido crecimiento, sumergido una parte y superficial. No presenta estroma, setae e hyphopodia ausente. Los conidióforos macronematosos, mononematosos, rectos o flexuosos, incoloros o con la parte superior de mediados de color marrón oscuro, generalmente suave, hinchada en el ápice en una vesícula esférica cuya superficie está cubierta por ramas cortas o en algunas especies de fíalides; las ramas están en una o varias series. Células conidiógenas monofialides, discretas, conidios catenados, secos, semi-endógenos esféricos, de diversos colores, suaves o rugosos en ocasiones equinulados, a veces con espinas dispuestas en espiral, o septados (Mycobank, 2012).

1. *Aspergillus niger* (Tiegh.). Cepas: 024 y 063.

Características macroscópicas: colonias de apariencia granulosa, efusas, filamentosas y de textura suave. El color es inicialmente blanco, se vuelve negro en la parte superior en cultivos maduros, la parte inferior permanece color amarillo pálido. Colonias de rápido crecimiento (3-5 días), micelio parcialmente sumergido y parcialmente superficial.

Características microscópicas: conidióforos erectos, derechos o flexuosos, con más de 3mm de longitud y 15-20 μm de ancho, incoloros o con la parte superior café, ápice con vesícula esférica de 40-70 μm de diámetro usualmente, la superficie de la vesícula estrechamente empaquetada con ramificaciones de 20-40 μm de longitud y 5-6 μm de ancho in la parte más ancha. Con fíalides en grupos en los ápices de las ramas con forma de botellas de 7-10 μm de longitud y 1-5 μm de ancho en el extremo abierto. Conidia catenada, seca, usualmente globosa, café-parda, equinulada, algunas ocasiones con espinas arregladas en bandas discontinuas.

A.



B.

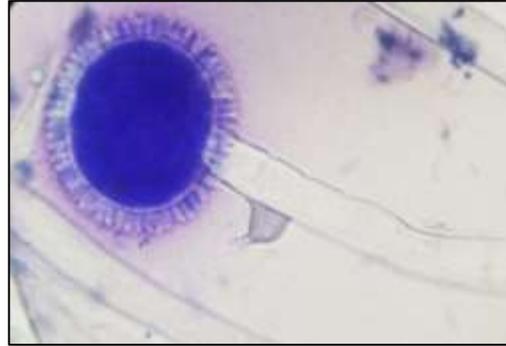


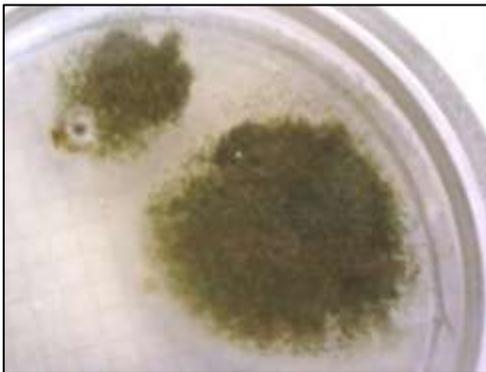
Figura 15. *Aspergillus niger*. A. En medio agar PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x) conidióforo.

2. *Aspergillus* sp.1 Cepas: 015, 021 y 061.

Características macroscópicas: colonias efusas, micelio de aspecto polvoso, de color verde oscuro, rápido crecimiento, abundantes esporas, 3-8 cm de diámetro en 5 días en medio PDA, reverso color rosa pálido a beige.

Características microscópicas: conidióforos rectos, hialinos, gruesos, cortos, vesícula de esférica a elipsoidal, superficie cubierta por fialides cortas, anchas, color oliváceo, conidios secos, esféricos, de color verde, pared gruesa y lisa.

A.



B.

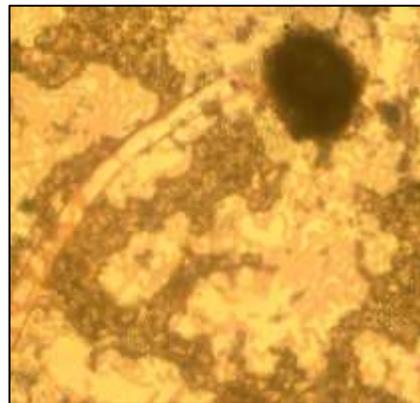


Figura 16. *Aspergillus* sp.1 A. En medio agar PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x) conidióforo.

3. *Aspergillus* sp.2 aff. *Flavus* (Link). Cepa 060.

Características macroscópicas: colonias alcanzan un diámetro de 3,5 cm en 7 días a 25°C, usualmente presentan micelio blanquecino los primeros días después cambia a verde-amarillo, verde-claro, verde-oscuro, de textura pulverulenta, el margen de la colonia es de color blanco, de textura algodonosa, el reverso es de color crema, verde-oscuro.

Características microscópicas: conidióforos hialinos, ligeramente rugosos, vesícula globosa a subglobosa de 20-35 µm de diámetro, fíalides crecen directamente sobre la vesícula, o sobre métulas, fíalides de 6-10 x 4-5,5 µm y métulas de 6,5-10 x 3-5 µm. Conidios globosos a subglobosos, 3-3,5 µm de diámetro de color verde claro.

A.



B.

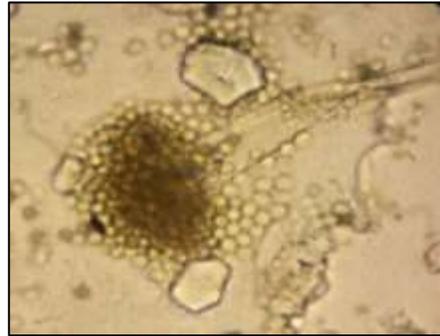


Figura 17. *Aspergillus flavus* (060). A. En medio agar PDA (4 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidióforo.

4. *Aspergillus* sp.3 Cepa 070.

Características macroscópicas: colonias de color verde oscuro y verde claro con anillos blanquecinos, textura afelpada, vellosa, centro elevado, en cultivos maduros con exudado o estructuras de color rosa al centro de la colonia en la parte superior, 3,5 -5,5 cm de diámetro en 8 días en medio PDA, reverso color crema-beige.

Características microscópicas: conidióforos rectos, hialinos, gruesos, cortos, septados, pared doble, lisa, interior con granulaciones, vesícula semi-esférica, conidios secos, esféricos, de color verde, pared gruesa y lisa, se observa poro apical o germinal, abundantes.

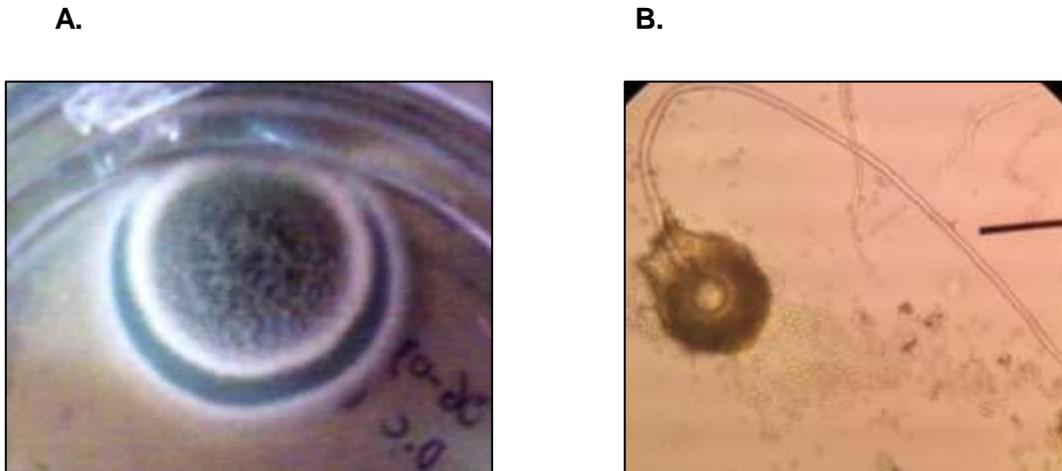


Figura 18. *Aspergillus* sp.3 A. En medio agar PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

Género: *Curvularia*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

***Curvularia* spp.:** Colonias efusas, de color pardo café, grises o negras, micelio algodonoso o aterciopelado, el micelio está sumergido en sustratos naturales. Estromata a menudo largo, erecto, negro, cilíndrico, en ocasiones ramificado, es formado en muchas especies en cultivos especialmente en sustratos firmes. Conidióforos macronematosos, mononematosos, derechos o ligeramente curvos, a menudo geniculados, nodosos, de color café usualmente suaves, células conidiogenas politétricas, integradas, terminales en ocasiones con el tiempo se vuelven intercalares, simpoides, cilíndricas, en ocasiones hinchadas. La conidia solitaria, acropleurogena, simple, curva, clavada, amplicamente fusiforme, de ovoide a piriforme, a menudo con 3 o más septos transversales, de café claro a oscuro, en ocasiones con bandas oscuras en los septos, de suaves a verrucosas, el hilio en algunas especies es protuberante, en muchas especies se forma una estauroconidia tirriada al mismo tiempo que una conidia normal (Mycobank, 2012).

1. *Curvularia pallescens* (Boedijn). Cepas: 037, 041 y 044.

Características macroscópicas: Colonias dispersas, de aspecto lanoso a menudo desarrollan zonas concéntricas de color grisáceo a café y pardo oscuro al reverso, de borde irregular, micelio inmerso y poco elevado, en ocasiones se evidencian producción de exudados.

Características microscópicas: conidióforos simples, raramente ramificados, derechas y en ocasiones geniculadas cerca del ápice, café, variable en tamaño hasta 5-6 μm de ancho. Conidia pared suave, café claro, generalmente con 3 septos, elipsoidales a fusiformes, usualmente ligeramente curvada de 17-31 x 7-12 μm .

A.



B.



Figura 19. *Curvularia pallescens*. A. En medio agar PDA (7 días). B. Estructuras microscópicas (40x), conidios.

2. *Curvularia aff. eragrostidis* (Henn.) (J.A. Mey).

Características macroscópicas: Colonias con coloraciones de grisáceas a oliváceas, centro elevado, inmerso, reverso pardo oscuro con arrugas, textura lanosa, colonias de 2,5-4,0 cm de diámetro a los 8 días de cultivo en medio PDA.

Características microscópicas: conidios elipsoidales o en forma de barril, rectos, en su mayoría con 3 septos, el septo del medio comúnmente más oscuro y grueso, pared suave, las células del septo medio de mayor e igual tamaño, a menudo gruesas y muy oscuras, central marrón o marrón oscuro, las células terminales mucho más pálidas y suaves.

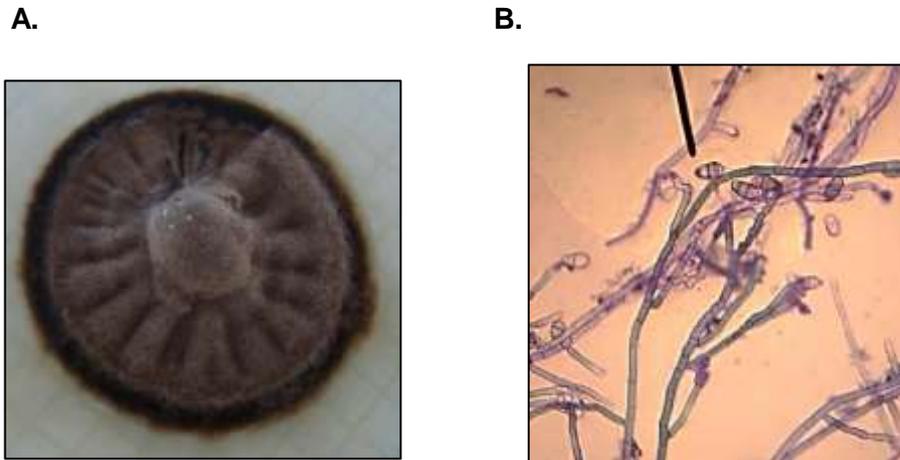


Figura 20. *Curvularia* sp.2, *aff. eragrostidis* (042). A. En medio agar PDA (7 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

3. *Curvularia clavata* (B.L. Jain). Cepa 048.

Características macroscópicas: colonias difusas, marrón-grisáceo o marrón, de textura algodonosa, poco elevadas, reverso pardo oscuro, rápido crecimiento en medio PDA, las colonias alcanzan 5 cm de diámetro en 7 días en medio PDA a 28°C.

Características microscópicas: conidióforos rectos o flexuosos, en ocasiones geniculados, marrones, de pares lisa de 150 µm de largo 2,0-5,5 µm de ancho, conidia marrón, pared lisa, recta ocasionalmente ligeramente curvada, usualmente clavada, con tres septos, negruzcos- marrones, célula basal más pálida.

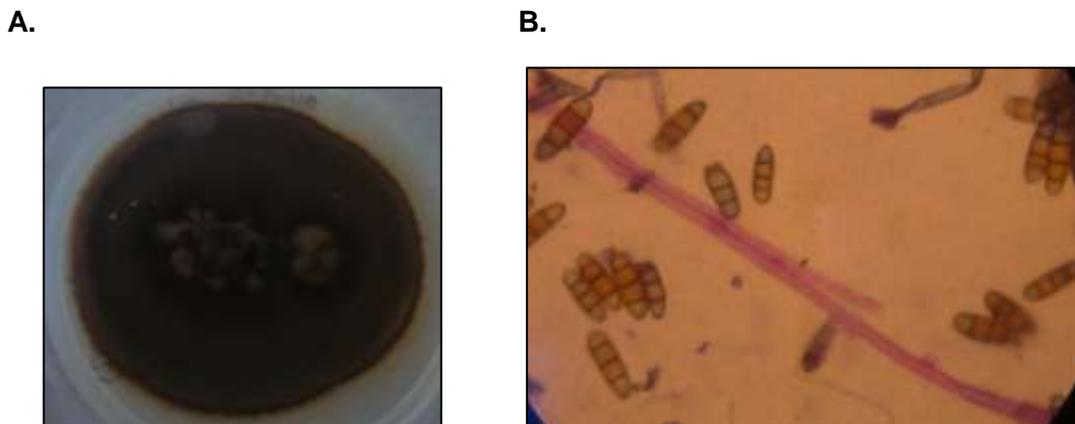


Figura 21. *Curvularia clavata* (048) A. En medio agar PDA (5 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

4. *Curvularia* sp.1 Cepas: 029 y 034.

Características macroscópicas: colonias de color pardo-grisáceo, micelio afelpado-aterciopelado, bordes irregulares, ramificados, micelio sumergido y aéreo con centro elevado, reverso marrón oscuro, cambio de color en el medio PDA a un color café claro, 3,5- 7,5 cm de diámetro en 8 días de cultivo.

Características microscópicas: Hifas septadas, delgadas, de pared doble, rectas, sin ramificaciones, pared lisa, hialinas, conidias septadas, con pedúnculo basal, pared doble, color oliváceo, gruesa, solitaria, simple, recta, fusiforme.

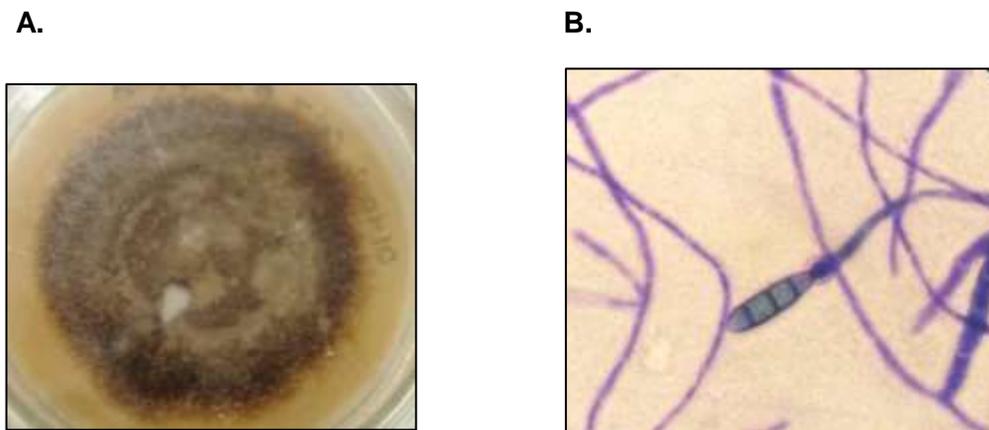


Figura 22. *Curvularia* sp.1 A. En medio agar PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

Género: *Fusarium*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

***Fusarium* spp.** (Link, H. F): Colonias de micelio extensivo y de aspecto algodonoso en medios de cultivo, a menudo con una coloración rosa, purpura o amarilla, en el micelio o en el medio. Conidióforos variables, delgados y simples, o robustos y cortos, ramificados

irregularmente, con un ramillete de fialides, simples o agrupadas en esporodoquias, conidias (fialosporas) hialinas, variables, principalmente de dos tipos, a menudo contenidas en pequeñas cabezas húmedas, macroconidia de ovoide a oblonga simple o en cadenas, algunas conidias intermedias, 2-3 células, oblongas o ligeramente curvadas, algunas especies forman esporodoquias y clamidiosporas (Barnett y Hunter, 1998).

1. *Fusarium* sp.1 Cepas: 023, 043 y 049.

Características macroscópicas: colonias de rápido crecimiento 5-8 cm en 8 días en medio PDA, micelio de textura algodonosa o vellosa, con tonalidades rosa pálido, rosa amarillo oscuro, ocre, en el reverso presenta manchas de color rosa intenso con tonalidades ocráceas y amarillas, borde irregular, abundante micelio superficial elevado.

Características microscópicas: conidióforos cortos, robustos, ramificados, fialosporas alargadas hialinas, pared lisa, agrupadas, macroconida alargada, hifas delgadas, rectas, dobles.

A.



B.



Figura 23. *Fusarium* sp.1 A. En medio agar PDA (15 días). B Estructuras microscópicas (100x).

2. *Fusarium* sp.2 Cepas: 059 y 062.

Características macroscópicas: colonias de rápido crecimiento 4,5-7,5 cm en 8 días en medio PDA, micelio de textura afelpada semi-algodonosa, color rosa pálido, en el reverso rosa pálido con algunas manchas de color rosa intenso en cultivos viejos.

Características microscópicas: conidióforos delgados, simples, fialosporas alargadas hialinas, macroconida ovoide, hifas delgadas, rectas, sin septos, no se observan clamidiosporas.

A.



B.

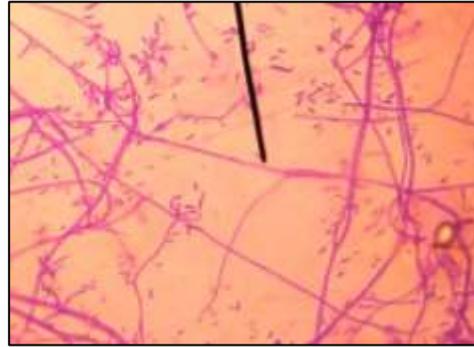


Figura 24. *Fusarium* sp.2 A. En medio agar PDA (7 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

Género: *Penicillium*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

***Penicillium* spp.** (Link, H.F.): Colonias inicialmente blancas y vellosas, esporas pigmentadas de color verde, azul verdosa o amarilla, la superficie de la colonia puede ser algodonosa, aterciopelada o pulverulenta, algunas especies pueden presentar exudados en la superficie y pigmentaciones rojizas al reverso. Conidióforos surgen del micelio simple o en ramificaciones cerca al ápice, peniciliados, terminando en un grupo de fálides, la conidia (fialosporas) son hialinas o coloreadas y brillantes en masas, unicelulares, forma globosa u ovoide en cadenas basipetalas secas (Barnett y Hunter, 1998).

1. *Penicillium* sp.1 Cepa 002.

Características macroscópicas: colonias efusas, textura polvosa, centro elevado, color verde oliváceo, bordes blancos, reverso crema-beige, con manchas rojizas en cultivos viejos, 2,5-3 cm en 5 días de cultivo en medio PDA.

Características microscópicas: conidióforo peniciliado, biverticilados, hialinos, pared lisa, fialides en grupos de 3 a 4 métulas cortas, conidios globosos, elípticos, de color verde-azulado, pared lisa y gruesa.

A.



B.



Figura 25. *Penicillium* sp.1 A. colonias en medio agar PDA (7 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

2. *Penicillium* sp.2 Cepas: 003 y 065.

Características macroscópicas: colonias con micelio algodonoso de color azul-grisáceo y borde blanco, centro elevado con granulaciones o exudado de color amarillo, reverso crema-beige, 2,5-5 cm en 8 días de cultivo en medio PDA.

Características microscópicas: conidióforo triverticilados, hialinos, pared lisa, fialides en grupos de 3 a 6 métulas cortas, conidios en cadenas conidiales, globosos, de color verde-amarillo, pared lisa.

A.



B.



Figura 26. *Penicillium* sp.2 A. En medio agar PDA (7 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

2. *Penicillium* sp.3 Cepas: 005 y 007.

Características macroscópicas: colonias con micelio polvoso, afelpado de color verde-grisáceo, bodes irregulares, centro elevado, colonias sumergidas y con arrugas, reverso de color crema-beige, 1,5-3,5 cm en 10 días de cultivo en medio PDA.

Características microscópicas: conidióforo triverticilados, hialinos, pared lisa, hifas septadas, hialinas, fálides en grupos de 3-4 métulas cortas, conidios en cadenas conidiales, globosos, de color verde-azulado, pared lisa.

A.



B.



Figura 27. *Penicillium* sp.3 A. colonias en medio agar PDA (7 días). B.). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

2. *Penicillium* sp.4 Cepas: 008, 011, 016, 068 y 069.

Características macroscópicas: colonias con micelio velloso, de color verde, bordes irregulares, centro elevado, exudado rojizo, reverso de color crema-beige con manchas rojizas, 2,5-5,5 cm en 10 días de cultivo en medio PDA.

Características microscópicas: conidióforo triverticilados, hialinos, pared lisa, fálides en grupos de 3-4 métulas cortas, conidios en cadenas conidiales, globosos, de color verde-azulado, pared lisa.

A.



B.

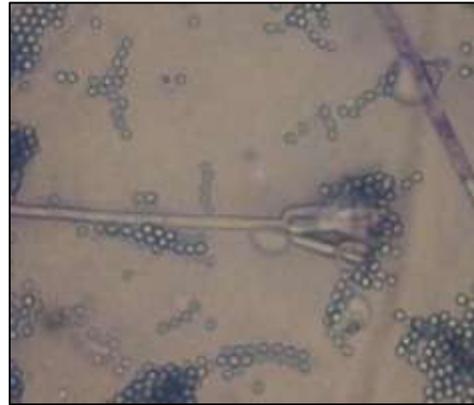


Figura 28. *Penicillium* sp.4 A. colonias en medio agar PDA (7 días). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

Género: *Stemphylium*

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

***Stemphylium* spp.** (Wallr): Colonias efusas con coloraciones que van del grisáceo, marrón, oliváceo-marrón a negro, textura aterciopelada o algodonosa. El micelio se encuentra sumergido parcialmente o de forma superficial, reverso de color pardo oscuro o misma tonalidad que la superficie, con arrugas, bordes irregulares. Estroma a veces presente, setos y hypopodia ausentes, conidióforos macronematosos, mononematosos, dispersos o cespitosos, no ramificados o en ocasiones ligeramente ramificados, rectos o flexuosos, generalmente nudosos con una serie de inflamaciones vesiculares, pálidos o con alguna coloración ligera de color marrón o marrón oliváceo, liso o en parte verruculoso. Células conidiógenas monoblásticas integradas, terminales, al principio clavadas o subesféricas con la pared delgada en ápice, con el tiempo, se vuelve calciforme por invaginación. Los conidios son solitarios, seco, acrogénos, oblongas, con los extremos redondeados, elipsoidales, obloides o subesféricas, algunas especies con un ápice cónico puntiagudo y otras con protuberancias cónicas laterales, de color oliváceo o marrón oscuro de pared lisa, verrugosa o equinulado, muriformes, a menudo constreñida en uno o más septos, con poro en la base (Ellis, 1971).

1. *Stemphylium* sp.1 Cepas: 012 y 028.

Características macroscópicas: colonias con micelio aterciopelado o polvoso, color marrón oliváceo, con anillos concéntricos más claros, borde verde oliváceo claro, radiado, centro elevado, con arrugas, micelio sumergido parcialmente, reverso color marrón oscuro con arrugas, 4,5- 6,7 cm de diámetro en medio PDA a los 10 días de cultivo.

Características microscópicas: conidióforos nudosos, color marrón-verdoso, hifas septadas, hialinas, pared lisa, ramificadas, conidios oblongos, de color oliváceo a marrón oscuro de pared lisa, aspecto muriformes, septados y con poro en la base.

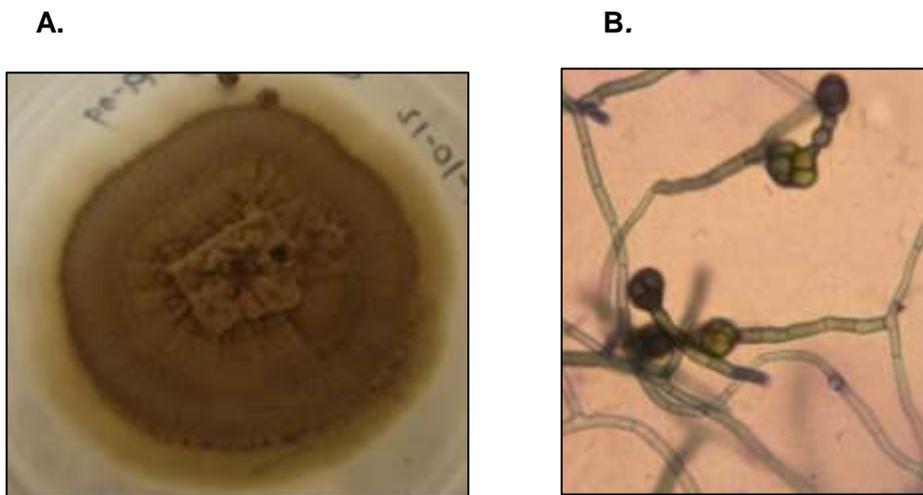


Figura 29 *Stemphylium* sp.1 A. colonias en medio agar PDA (14 días). B.). B. Estructuras microscópicas (100x), conidios e hifas.

- **Cepas aisladas no identificadas.**

Género: no identificado.

Division: Ascomycetes.

Reino: Fungi

1. Cepa 004: Colonias afelpadas-vellosas, color grisáceo claro, con arrugas, sumergido, bordes lisos, reverso color crema con arrugas, 1,5-3,0 cm de diámetro en medio PDA 10 días. Hifas gruesas, anchas, septadas, con tabiques, algunas delgadas alargadas, pared lisa, no se observan conidióforos ni conidios.

A.



B.



Figura 20. Cepa no identificada (004). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

2. Cepa 006: colonias de textura ramificada, afelpada a cerosa, color rosa pálido con centro pardo oscuro, centro elevado con arrugas, bordes irregulares, de color más claro, 2-3,5 cm de diámetro en medio PDA en 8 días. Hifas cortas, gruesas, septadas, conidióforos globosos, hialinos.

A.



B.

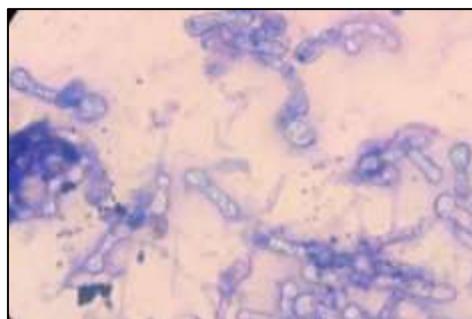


Figura 31. Cepa no identificada (006). A. Micelio en medio PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

3. Cepa 017: Colonias de color blanco inicialmente, naranja- ocre en cultivos viejos, micelio de textura vellosa, bordes lisos, centro elevado de color ocre, reverso color crema, borde liso, 2-5cm de diámetro en 8 días en PDA. Hifas delgadas, alargadas, pared lisa, simples, sin septos, conidióforos cortos, rectos, algunos ramificados, conidia esférica, lisa, solitaria, hialina.

A.



B.

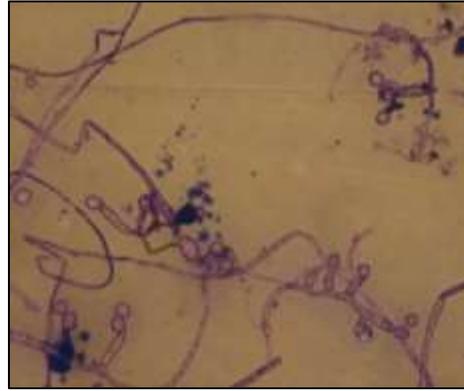


Figura 32. Cepa no identificada (017). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

4. Cepa 020: colonias similares a la colonia 006, textura ramificada, afelpada a cerosa, aspecto como tipo levadura, color rosa pálido con centro pardo oscuro, centro elevado con arrugas, bordes irregulares, ramificados, de color más claro, 2-3,5 cm de diámetro en medio PDA en 8 días, hifas alargadas, pared lisa, delgadas, septadas, conidios globosos, hialinos.

A.



B.



Figura 33. Cepa no identificada (020). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

5. Cepa 025: colonias de micelio sumergido, textura tipo levadura, bordes irregulares, ramificados, presencia de anillos concéntricos color grisáceos, colonia de color crema-blanquecino, reverso blanco, 2,5-5 cm de diámetro. Hifas cortas, gruesas, septadas, hialinas, pared lisa, ramificadas o simples, conidióforos alargados,

rectos, pared lisa, conidia ovalada, alargada, delgada, terminaciones en punta, solitaria o en cadenas.

A.



B.



Figura 34. Cepa no identificada (025). A. Micelio en medio PDA (14 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

6. Cepa 026: colonias ramificadas, bordes irregulares, textura afelpada, centro elevado, color beige-crema, centro de color más intenso, con tonalidades grisáceas, reverso crema, con manchas grisáceas, rápido crecimiento, 2,5-7,5 cm en 8 días en medio PDA. Hifas alargadas, delgadas, simples o ramificadas, no se observan conidias.

A.



B.

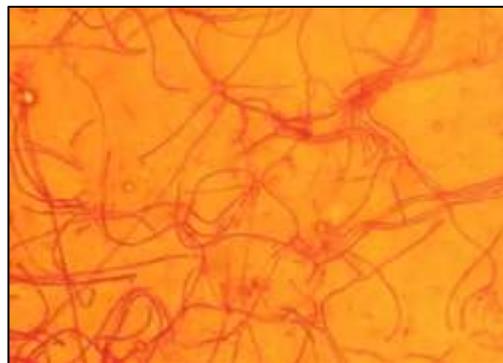


Figura 35. Cepa no identificada (026). A. Micelio en medio PDA (12 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

7. Cepa 036: colonias con micelio velloso-lanoso, sumergido, con arrugas, color rosa pálido, borde liso, irregular, reverso color rosa, rojizo, 1,5- 4,5 cm de diámetro en 8 días. Hifas alargadas, ramificadas, simples, pared lisa, septadas, centro con estructuras celulares, no se observan conidióforos o conidios.

A.



B.



Figura 36. Cepa no identificada (036). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

8. Cepa 038: colonias con textura algodonosa, velloso, centro elevado, color grisáceo y pardo rojizo, borde irregular, reverso color marrón claro, presenta exudado, 2-6,5 cm de diámetro en 10 días de cultivo en PDA. Hifas ramificadas, bordes irregulares, lisos, con tabiques, no se observan conidios, posible género *Alternaria* sp.

A.



B.



Figura 37. Cepa no identificada (038). A. Micelio en medio PDA (10 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

9. Cepa 045: colonias con micelio de textura polvosa, poco elevado, color grisáceo-rojizo. Bordes más claros e irregulares, reverso marrón-rojizo, liso, hifas con septos de corta distancia entre ellos, pared lisa, simples y ramificadas, alargadas, delgadas, conidióforos cortos rectos a curvos, lisos, no se observan conidios.

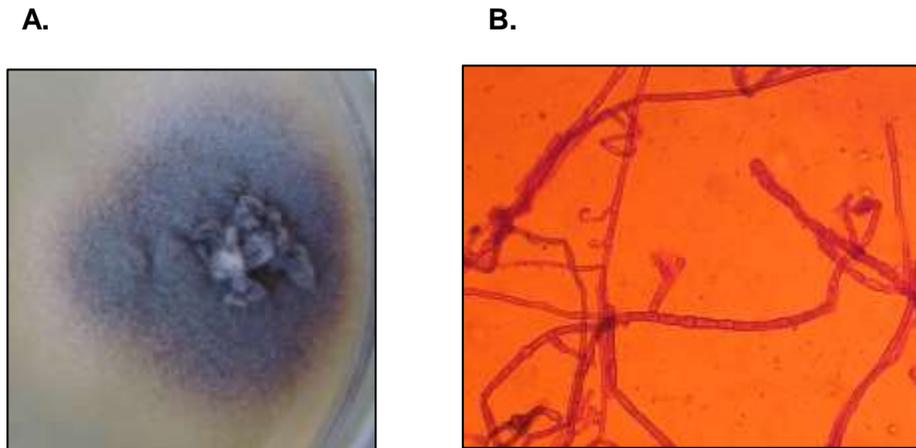


Figura 38. Cepa no identificada (045). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

10. Cepa 047: colonias similares a la colonia 006 y 020, textura ramificada, afelpada a cerosa, aspecto como tipo levadura, color rosa pálido y grisáceo con centro pardo oscuro, centro elevado con arrugas, bordes irregulares, ramificados, de color más claro, 1,5-3,5 cm de diámetro en medio PDA en 8 días, hifas alargadas, pared lisa, delgadas, septadas, conidios globosos, hialinos.

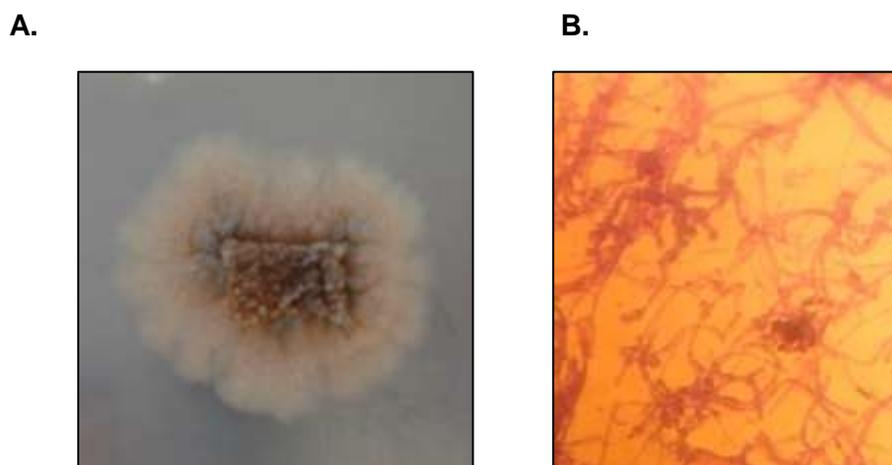


Figura 39. Cepa no identificada (047). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

11. Cepa 066: Colonias de color verde-oliváceo o marrón, borde irregular, con arrugas, textura afelpada o vellosa, reverso color pardo oliváceo oscuro, con arrugas, 1,5-3,0 cm de diámetro en medio PDA en 10 días. Hifas hialinas, de pared lisa, simples o ramificadas, septadas, septos cortos, con tabiques, conidióforos y conidios redondeados, esféricos, hialinos, unicelular, pared lisa.

A.



B.



Figura 40. Cepa no identificada (066). A. Micelio en medio PDA (12 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

12. Cepa 071: Colonias de micelio sumergido color rojizo con micelio aéreo de textura algodonosa color blanco, con centro elevado, con arrugas y bordes irregulares, reverso color rojizo fuerte, liso, rápido crecimiento 2,5- 6,5 cm de diámetro en medio PDA en 5-7 días. Hifas cortas, gruesas, con septos, hialinas, pared gruesa, conidióforos cortos fusiformes, pared lisa, dentro más ancho, zonas apicales y basales más angostas, simples o agrupados 2-3 conidióforos, conidios esféricos, pared lisa, hialinos, con poro germinal o apical.

A.



B.

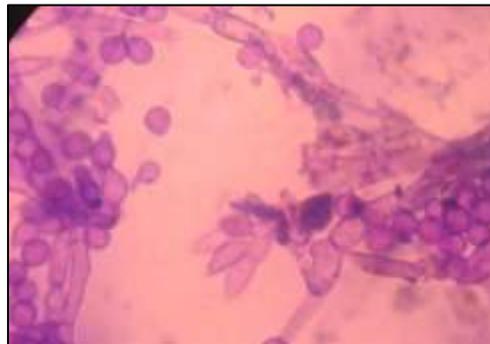


Figura 41. Cepa no identificada (071). A. Micelio en medio PDA (8 días). B. Estructuras microscópicas (100x).

Anexo 3.

3.1. Espectros de masa de los distintos extractos fúngicos de las cepas de *Acremonium* spp. empleados en las pruebas de actividad antimicrobiana.

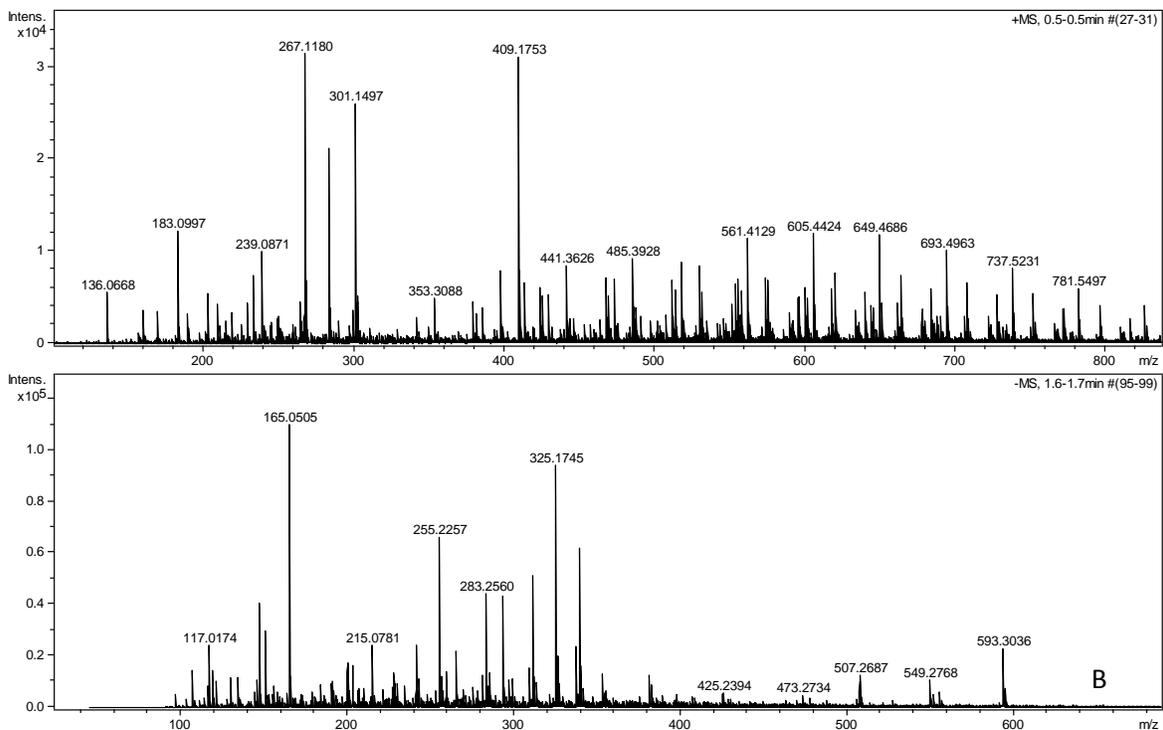


Figura 1. Espectro de masas del extracto de *A. strictum* (039), adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

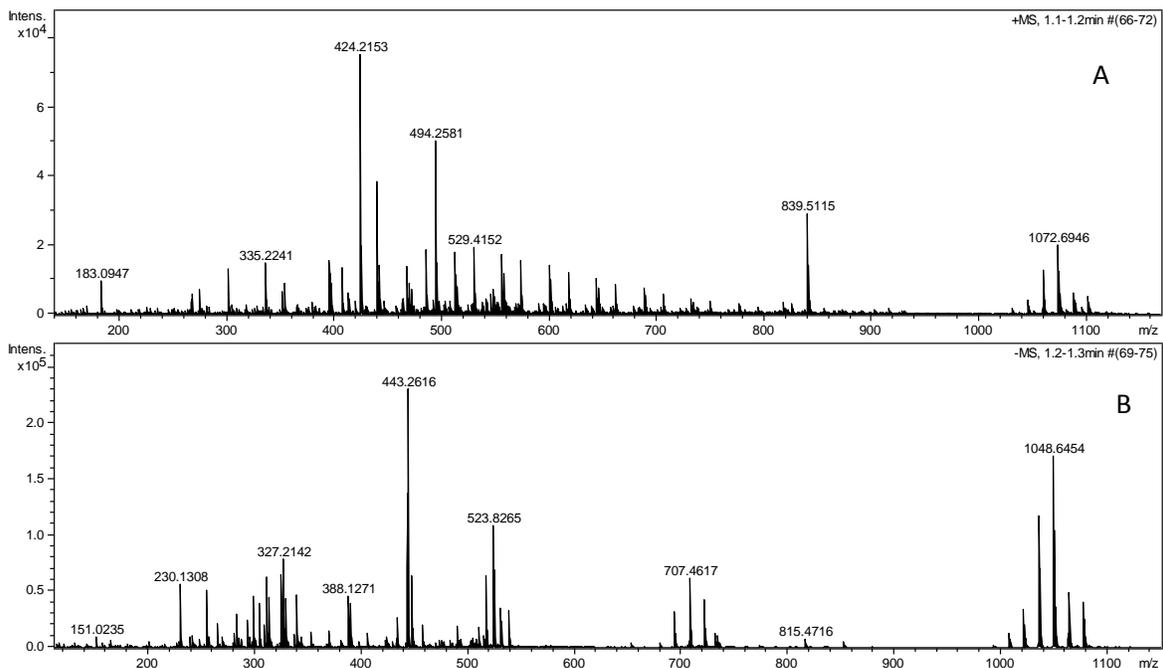


Figura 2. Espectro de masas del extracto de *Acremonium* sp4. (040)Ac, adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

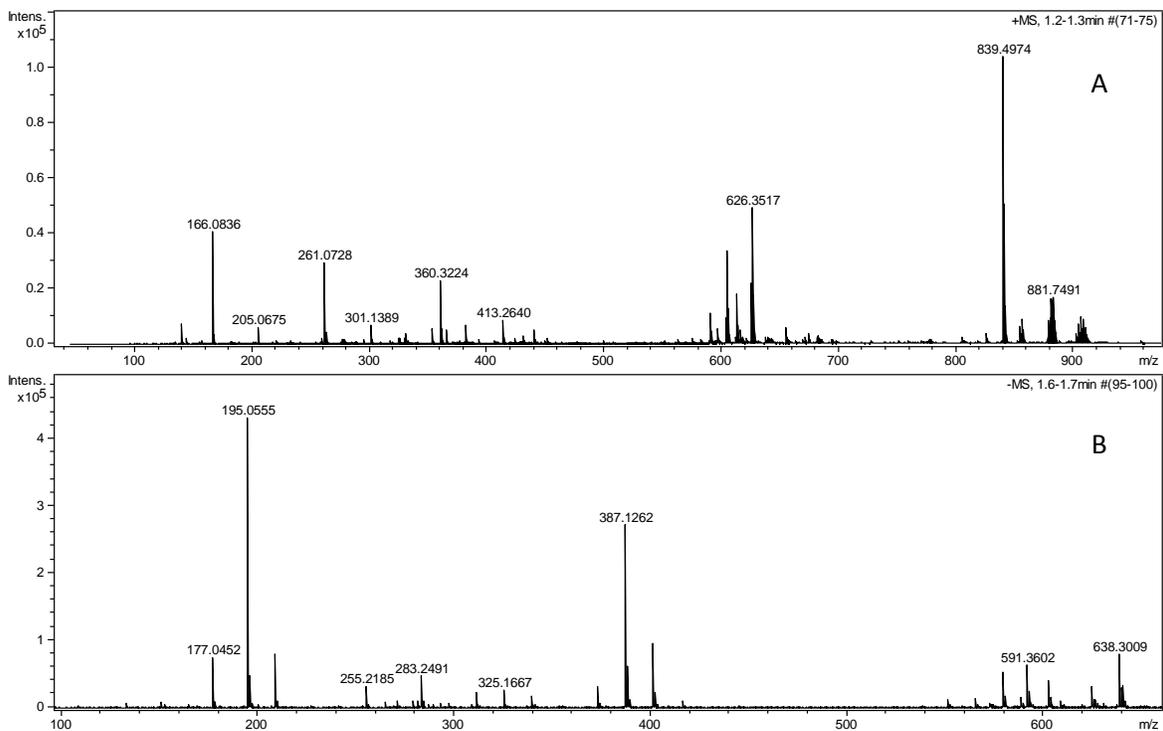


Figura 3. Espectro de masas del extracto de *Acremonium sp4. (040) Ex*, adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

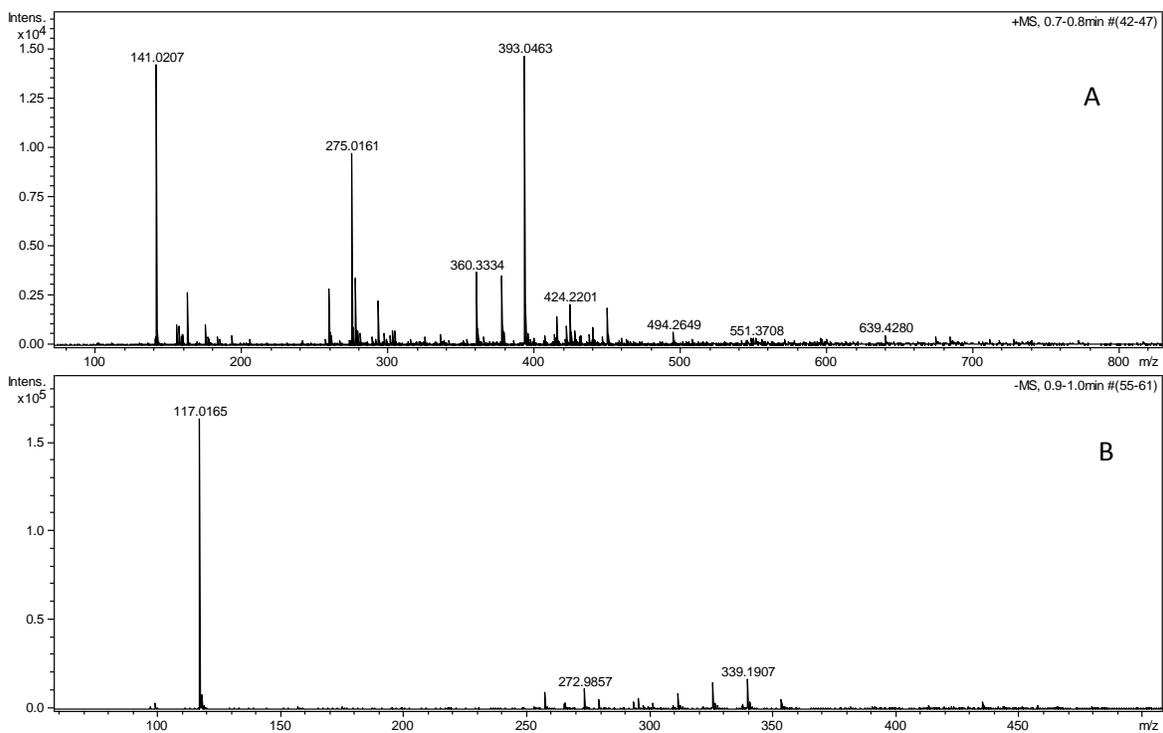


Figura 4. Espectro de masas del extracto de *Acremonium sp4. (040) SM*, adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

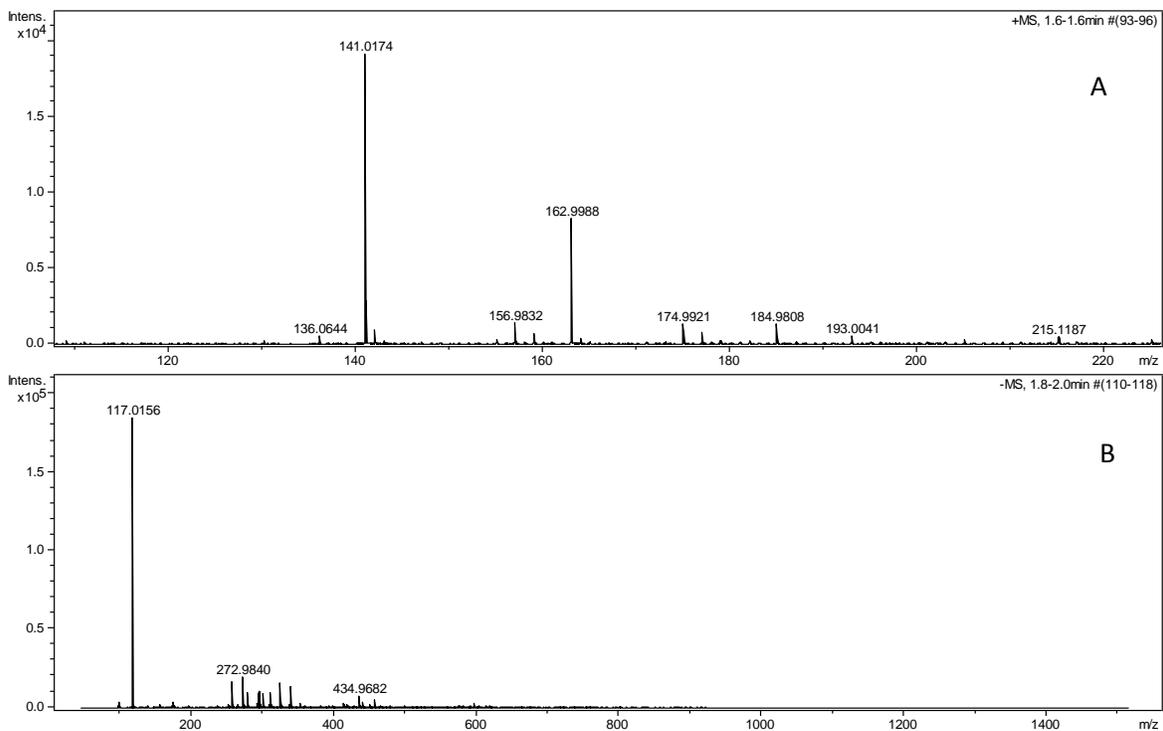


Figura 5. Espectro de masas del extracto de *Acremonium sp5. (058)*, adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

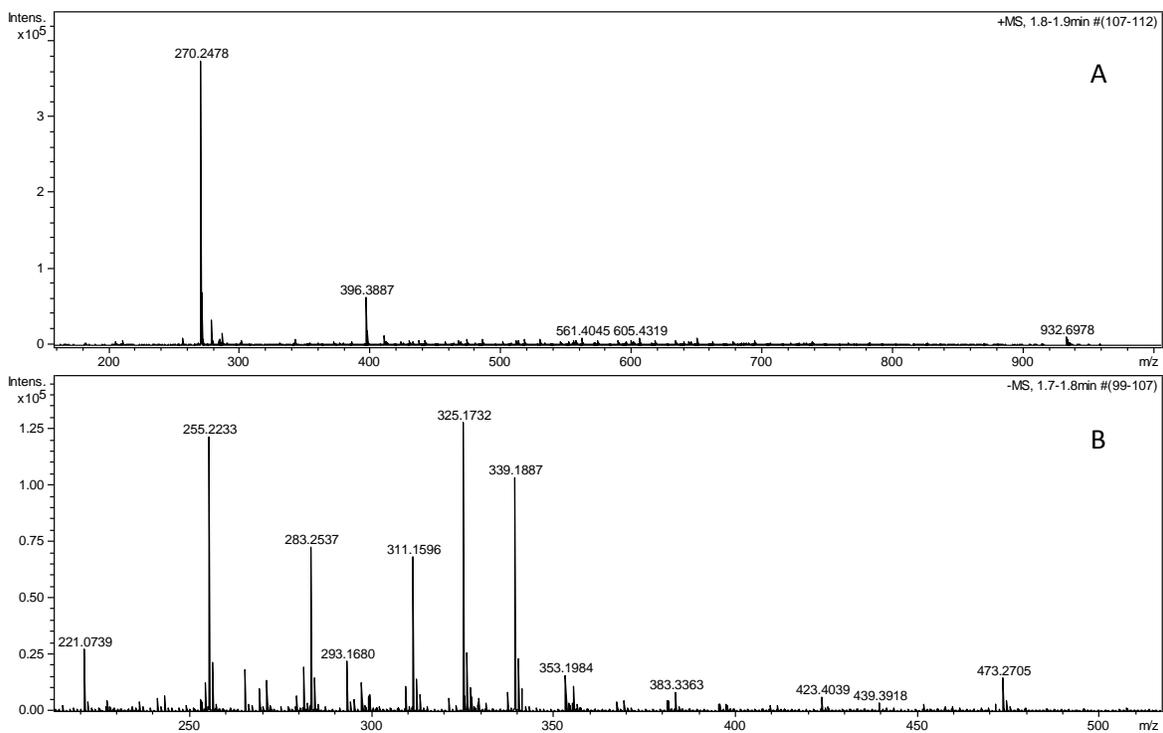


Figura 6. Espectro de masas del extracto de *Acremonium sp6. (050)*, adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

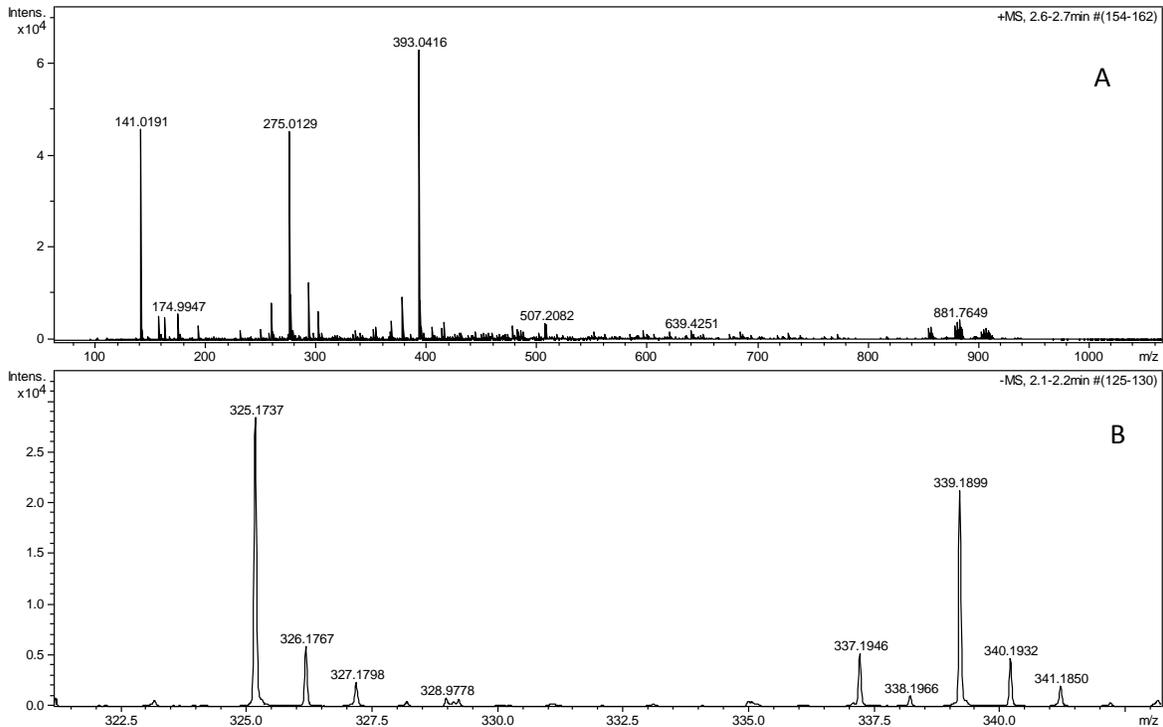


Figura 7. Espectro de masas del extracto de *Acremonium sp2. aff. killiense* (064), adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

3.2. Espectros de masa de los distintos extractos fúngicos de las cepas de *Aspergillus sp1.* y *A. niger*.

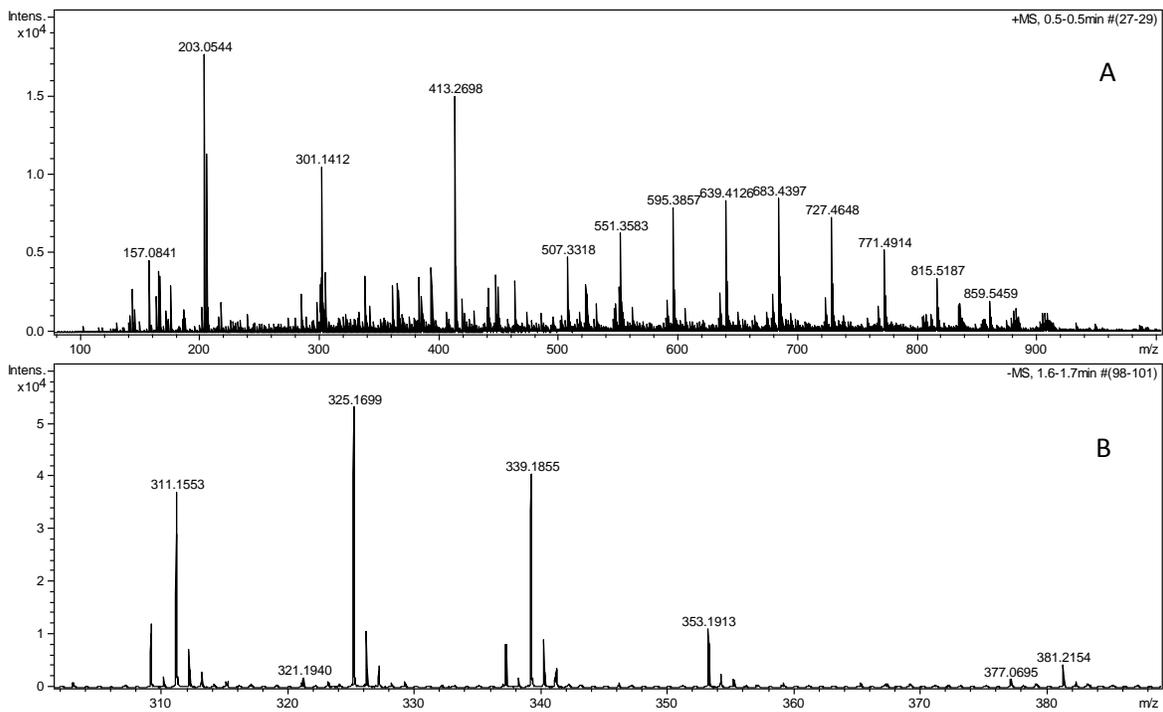


Figura 8. Espectro de masas del extracto de *Aspergillus sp1.* (021), adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

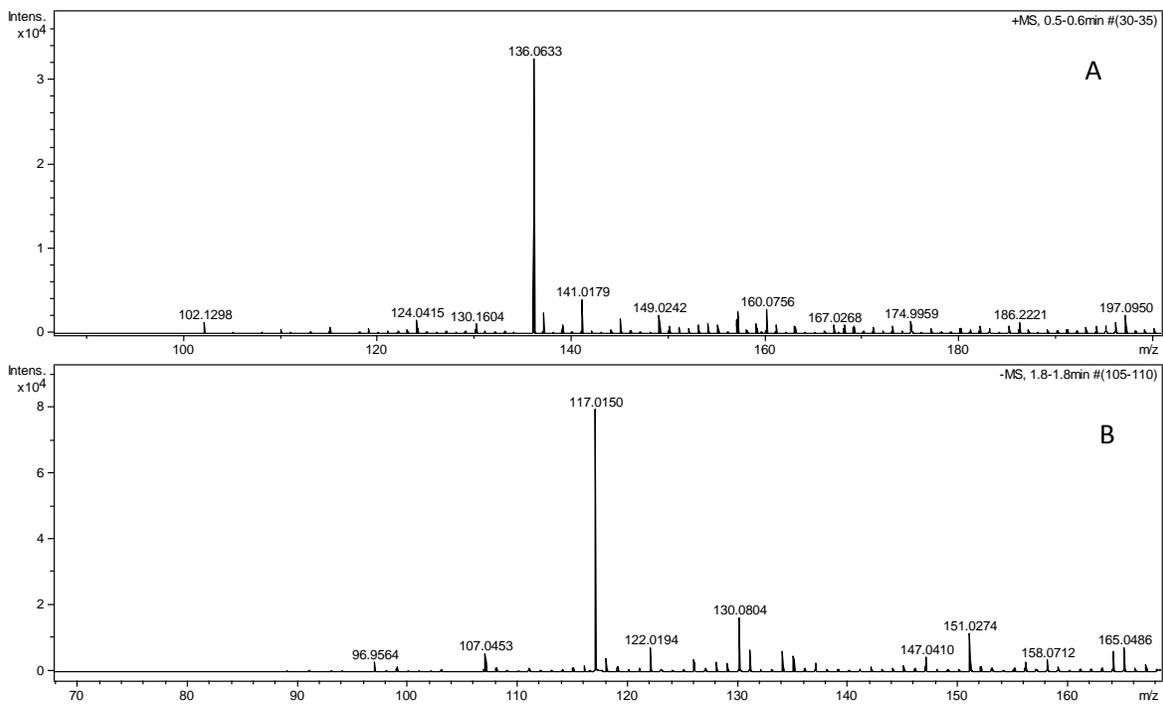


Figura 9. Espectro de masas del extracto de *Aspergillus niger* (024), adquirido en modo positivo (A) y negativo (B).

Anexo 4. Fotografías microscópicas de estructuras fúngicas de *Curvularia clavata* en cultivo doble con *Acremonium* sp. (050).

Se evidenció micelio de *Acremonium* sp. (050) creciendo sobre *C. clavata* (A), (B). Esporas de *Acremonium* sp. (050) de menor tamaño (1), rodean a las esporas de *C. clavata* de mayor tamaño (2) y se adhieren a los poros germinativos (C). Microscopio óptico Zeiss KS KF2®, observaciones a 40x (A) (B) y 100x (C).

