



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

CARRERA DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

“Estudio de la microbiota endofítica asociada a trigo y soja y su significancia en la interacción con patógenos fúngicos”

Esp. Ing. Agr. Silvina Larran

Directora: Dra. Analía Perelló

Codirectora: Dra. María Rosa Simón

2016

DEDICATORIA

A Nicolás

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente en todos mis emprendimientos.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales y a la Universidad Nacional de la Plata por brindarme la posibilidad de realizar esta formación de post-grado.

A mis queridas directoras, las Dras. Analía Perelló y María Rosa Simón por guiarme en todas las instancias de la tesis, experiencias y conocimientos transmitidos.

A los miembros del jurado que aceptaron evaluar esta tesis y cuyos aportes y correcciones realizadas con suma dedicación han permitido mejorar la calidad de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Ducid por su colaboración en las temáticas relacionadas a la diversidad específica.

A la Dra. Cecilia Mónaco por la identificación de las especies de *Trichoderma*.

A mis compañeros y amigos del CIDEFI por su incondicional apoyo e intercambio académico.

Finalmente agradezco a Nicolás, a Mario y a toda mi familia por su permanente apoyo, comprensión y tolerancia durante el desarrollo de la tesis.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL	16
1. LOS MICROORGANISMOS ENDOFITOS.....	17
2. LA MICROBIOTA ENDOFITICA Y EL CONTROL BIOLOGICO	23
3. EL CULTIVO DE TRIGO Y DE LA SOJA	26
3.1. Trigo: Importancia del cultivo.....	26
3.1.1. Subregiones ecológicas de la región triguera Argentina	29
3.2. Soja: Importancia del cultivo.....	30
3.2.1. Subregiones ecológicas de la región sojera Argentina	33
4. ENFERMEDADES DEL TRIGO Y DE LA SOJA	34
4.1. Principales enfermedades del trigo.....	35
4.1.1. Mancha amarilla de la hoja	36
4.2. Principales enfermedades de la soja	41
4.2.1. Podredumbre carbonosa.....	41
5. MANEJO INTEGRADO DE LA MANCHA AMARILLA Y DE LA PODREDUMBRE CARBONOSA.....	46
5.1. Manejo integrado de la mancha amarilla	46
5.2. Manejo integrado de la podredumbre carbonosa.....	47
6. HIPÓTESIS.....	48
7. OBJETIVO GENERAL	48
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
CAPITULO II. LA MICROBIOTA ENDOFITICA DEL TRIGO Y DE LA SOJA	50
1. MICROBIOTA ENDOFITICA ASOCIADA AL TRIGO.....	51
1.1. Antecedentes en trigo.....	51
1.2. Objetivos.....	52
1.3. Materiales y métodos	52

1.3.1. Micobiota endofítica de hojas de trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes estadios y condiciones ambientales.....	53
1.3.2. Micobiota endofítica del trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes órganos, estadios del ciclo fenológico del cultivo y en diferentes cultivares	55
1.4. Resultados	56
1.4.1. Micobiota endofítica de hojas de trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes estadios con distintas condiciones ambientales	56
1.4.2. Micobiota endofítica del trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes órganos, estadios del ciclo fenológico del cultivo y en diferentes cultivares	60
2. MICROBIOTA ENDOFITICA ASOCIADA A LA SOJA	70
2.1. Antecedentes en soja	70
2.2. Objetivos.....	72
2.3. Materiales y métodos	72
2.3.1. Relevamiento, aislamiento y caracterización de endófitos de diferentes órganos de la soja en seis estadios del ciclo fenológico del cultivo en condiciones ambientales diferentes	72
2.3.2. Micobiota endofítica de las semillas de soja.....	74
2.4. Resultados	74
2.4.1. Relevamiento, aislamiento y caracterización de endófitos de diferentes órganos de la soja en seis estadios del ciclo fenológico del cultivo en condiciones ambientales diferentes	74
2.4.2. Micobiota endofítica de las semillas de soja.....	90
3. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD ENDOFITICA DEL TRIGO Y DE LA SOJA	93
3.1. Diversidad endofítica	93
3.2. Objetivo	93
3.3. Materiales y métodos	94
3.4. Resultados	95
4. DISCUSION. ENDÓFITOS ASOCIADOS A TRIGO Y SOJA	104
5. CONCLUSIONES	110

CAPITULO III. ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA ENDOFITICA DEL TRIGO

FRENTE A <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	112
1. Antecedentes.....	113
2. Materiales y métodos.....	114
2.1. Pruebas de patogenicidad	114
2.2. Pruebas en condiciones controladas <i>in vitro</i>	114
2.2.1. Cultivos duales.....	114
2.2.2. Germinación de esporas	116
2.3. Prueba en condiciones semicontroladas <i>in vivo</i>	116
3. Resultados.....	118
3.1. Pruebas de patogenicidad	118
3.2. Pruebas en condiciones controladas <i>in vitro</i>	118
3.2.1. Cultivos duales.....	118
3.2.2. Germinación de esporas	124
3.3. Prueba en condiciones semicontroladas <i>in vivo</i>	125
4. Discusión	127
5. Conclusiones	130

CAPITULO IV: ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA ENDOFITICA DE LA

SOJA FRENTE A <i>Macrophomina phaseolina</i>	131
1. Antecedentes.....	132
2. Materiales y métodos.....	133
2.1. Pruebas de patogenicidad	133
2.2. Bioensayo de antagonismo frente a <i>M. phaseolina in vitro</i>	134
2.2.1. Cultivos duales.....	134
2.2.2. Bioensayos en semillas de soja peleteadas con endófitos en medio colonizado por <i>M. phaseolina</i>	135
2.3. Bioensayo de antagonismo frente a <i>M. phaseolina in vivo</i>	137
3. Resultados.....	140
3.1. Pruebas de patogenicidad	140
3.2. Bioensayo de antagonismo frente a <i>M. phaseolina in vitro</i>	141
3.2.1. Cultivos duales.....	141

3.2.2. Bioensayos en semillas de soja peleteadas con endófitos en medio colonizado por <i>M. phaseolina</i>	149
3.3. Bioensayo de antagonismo frente a <i>M. phaseolina in vivo</i>	151
4. Discusión	158
5. Conclusiones	161
CAPITULO V. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES	163
1. Discusión general	164
2. Conclusiones finales	170
3. Futuras investigaciones	171
BIBLIOGRAFIA GENERAL	173

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. ANAVA de las frecuencias de los endófitos foliares de trigo en el cultivar Klein Dragón, en tres estadíos fenológicos del ciclo del cultivo en dos campañas agrícolas.....	57
Tabla 2. Frecuencias de los endófitos foliares de trigo, en el cultivar Klein Dragón en tres estadíos del ciclo del cultivo en dos años	58
Tabla 3. Datos climáticos registrados durante los ensayos	59
Tabla 4. Muestras de plantas de trigo analizadas en los cinco cultivares en cinco estadíos fenológicos.....	61
Tabla 5. ANAVA de las frecuencias de los endófitos aislados de hojas, tallos, glumas y granos de cinco cultivares de trigo y en cinco estadios fenológicos del cultivo	61
Tabla 6. Frecuencias de los endófitos aislados de hojas, tallos, glumas y granos en cinco cultivares de trigo en cinco estadíos fenológicos.....	62
Tabla 7. ANAVA de las frecuencias de los endófitos en cada órgano del trigo en cinco cultivares y en diferentes estadíos fenológicos	64
Tabla 8. Frecuencias medias de los endófitos aislados de hojas, tallos, glumas y granos en cinco cultivares de trigo	64
Tabla 9. Órganos de soja analizados	75
Tabla 10. ANAVA para las frecuencias de los endófitos de soja en dos años, tres estadíos vegetativos del ciclo fenológicos del cultivo en hojas y tallos.	76
Tabla 11. Medias de las frecuencias de los endófitos aislados de dos órganos de la soja en tres estadíos vegetativos en dos años.....	77

Tabla 12. Medias de las frecuencias de los endófitos aislados de tres órganos de la soja en dos estadios reproductivos en dos campañas agrícolas	83
Tabla 13. ANAVA de los endófitos de vainas de soja en el estadio R8 en dos campañas agrícolas	88
Tabla 14. Medias de los endófitos de vainas de soja en el estadio R8 en dos campañas agrícolas	89
Tabla 15. ANAVA para la frecuencia de endófitos de semillas de soja	90
Tabla 16. Medias de la frecuencia de la micobiota endofítica de semillas de soja cosechadas en dos campañas agrícolas.....	91
Tabla 17. Datos climáticos registrados durante los ensayos de soja	92
Tabla 18. Índices de diversidad endofítica de cinco cultivares, cuatro órganos y cinco estadios del trigo y de cuatro órganos, seis estadios y dos años de un cultivar de soja	98
Tabla 19. Comparación de la riqueza específica e índices de diversidad de los endófitos aislados del cultivar Buck Poncho y de soja en una campaña agrícola	100
Tabla 20. ANAVA del efecto de los endófitos frente a <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> en cuatro tiempos de evaluación en cultivos duales (diámetros).	119
Tabla 21. ANAVA para las tasas de crecimiento de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> frente a los endófitos en cultivos duales en cuatro tiempos de evaluación.	119
Tabla 22. Medias de los diámetros y tasas de crecimiento de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> en presencia de endófitos de trigo, en cuatro tiempos de evaluación. ..	120
Tabla 23. Alteraciones de hifas y conidios de <i>P. tritici-repentis</i> en las zonas de proximidad con endófitos, en cultivos duales.....	122
Tabla 24. ANAVA de la germinación de esporas de <i>P. tritici-repentis</i> en suspensiones pareadas con endófitos.....	124
Tabla 25. ANAVA del efecto de la inoculación de endófitos en plántulas de trigo en la reducción de la severidad de la mancha amarilla.	125
Tabla 26. Medias del efecto de los endófitos en la severidad de la mancha amarilla en tres hojas de plántulas de trigo	126
Tabla 27. ANAVA del diámetro de crecimiento de <i>M. phaseolina</i> en cultivos duales con doce endófitos en comparación con el testigo	141
Tabla 28. Medias de los diámetros de crecimiento de las colonias de <i>M. phaseolina</i> en cultivos duales con 12 endófitos en dos experimentos	142
Tabla 29. Alteraciones de hifas de <i>M. phaseolina</i> en las zonas de interacción con los endófitos, en cultivos duales	143

Tabla 30. ANAVA del número de semillas de soja germinadas y del largo de radícula en diez tratamientos con endófitos.....	149
Tabla 31. Medias del número de semillas germinadas y largo de radícula de semillas de soja para los diez tratamientos con endófitos	150
Tabla 32. ANAVA del efecto de los endófitos en la protección frente a <i>M. phaseolina</i> en el bioensayo <i>in vivo</i>	151

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de trigo (Mt).....	28
Figura 2. Subregiones ecológicas de la región triguera Argentina.	30
Figura 3. Producción mundial de mundial de soja (Mt).	31
Figura 4. Subregiones de cultivo de soja.	34
Figura 5. Ascocarpos de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	38
Figura 6. Conidio del estado asexual de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	39
Figura 7. Síntomas de la mancha amarilla en hojas de trigo.	40
Figura 8. Microesclerocios de <i>Macrophomina phaseolina</i> en APG al 2%.	43
Figura 9. Síntomas de la podredumbre carbonosa en semillas de soja.	44
Figura 10. Síntomas de la podredumbre carbonosa en soja.....	45
Figura 11. Frecuencia de los endófitos aislados de cuatro órganos del trigo.	63
Figura 12. Frecuencia de los endófitos foliares en cuatro estadíos del trigo	66
Figura 13. Frecuencia de los endófitos de tallos de trigo en cuatro estadíos.	67
Figura 14. Frecuencia de los endófitos de glumas en cuatro estadíos.....	68
Figura 15. Frecuencia de los endófitos de granos en dos estadíos fenológicos. ..	69
Figura 16. Interacción endófitos × años en estados vegetativos de la soja.....	79
Figura 17. Interacción endófitos × estadíos vegetativos de la soja.	80
Figura 18. Interacción endófitos × órganos en estadíos vegetativos de la soja.....	81
Figura 19. Interacción endófitos × años en el estado reproductivos de la soja.	85
Figura 20. Interacción estadíos × endófitos en el estado reproductivo.	86
Figura 21. Interacción órganos × endófitos.....	87
Figura 22. Riqueza específica de endófitos en cinco cultivares de trigo.	95
Figura 23. Riqueza específica de endófitos en cinco estadíos del trigo.	96
Figura 24. Riqueza específica de endófitos en cuatro órganos del trigo.	96
Figura 25. Riqueza específica de endófitos en seis estadíos de la soja.	96
Figura 26. Riqueza específica de endófitos en cuatro órganos de la soja.	97
Figura 27. Abundancia relativa de especies endófitas en plantas de trigo.	99

Figura 28. Abundancia relativa de especies endófitas en plantas de soja.	99
Figura 29. Abundancia relativa de los endófitos del trigo y de la soja en una campaña agrícola.....	101
Figura 30. Diagramas de Venn. Endófitos compartidos por el trigo y la soja en hojas, tallos y granos.....	102
Figura 31. Pruebas de patogenicidad de los endófitos en trigo.....	118
Figura 32. Interacción de <i>P. tritici-repentis</i> en cultivos duales (APG al 2%).	121
Figura 33. Alteraciones de hifas y conidios de <i>P. tritici-repentis</i> en presencia de los endófitos en cultivos duales.	123
Figura 34. Pigmentación en las zonas de interacción <i>P. tritici-repentis</i> -endófitos.	124
Figura 35. Porcentaje de germinación de esporas de <i>P. tritici-repentis</i> en suspensiones pareadas con endófitos.....	125
Figura 36. Ensayo en invernáculo para evaluación del efecto de los endófitos en la reducción de la severidad de la mancha amarilla del trigo.....	126
Figura 37. Peleteado y siembra de semillas de soja en medio colonizado por <i>M. phaseolina</i>	137
Figura 38. Preparación del inóculo de <i>M. phaseolina</i>	138
Figura 39. Plántulas de soja creciendo en invernáculo.....	141
Figura 40. Placas de Petri sembradas en cultivos duales <i>M. phaseolina</i> -endófitos en APG al 2%.....	142
Figura 41. Alteraciones de <i>M. phaseolina</i> en interacción con <i>T. longibrachiatum</i>	144
Figura 42. Formación de haustorios en interacción de <i>M. phaseolina</i> con <i>T. longibrachiatum</i>	144
Figura 43. Alteraciones de <i>M. phaseolina</i> en interacción con <i>Penicillium</i> sp. 2....	145
Figura 44. Alteraciones de <i>M. phaseolina</i> en interacción con <i>T. koningii</i>	145
Figura 45. Alteraciones de <i>M. phaseolina</i> en interacción con <i>T. aureoviride</i>	146
Figura 46. Alteraciones de <i>M. phaseolina</i> en interacción con <i>T. harzianum</i>	146
Figura 47. Micelio de <i>M. phaseolina</i> pigmentado en la zona de interacción con <i>T. harzianum</i>	147
Figura 48. Interacciones en cultivos duales <i>M. phaseolina</i> - endófitos.....	148
Figura 49. Interacciones <i>M. phaseolina</i> -endófitos en cultivos duales a los 20 días.	148
Figura 50. Bioensayo de semillas peleteadas con endófitos frente a <i>M. phaseolina</i>	150

Figura 51. Comparación del largo de radícula de semillas de soja germinadas en medio colonizado por <i>M. phaseolina</i> y en APG al 2%.	151
Figura 52. Porcentaje de germinación de semillas de soja peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con <i>M. phaseolina</i> en comparación con los testigos.....	152
Figura 53. Cotiledones de soja con síntomas de podredumbre carbonosa.....	153
Figura 54. Plántulas de soja con síntomas de podredumbre carbonosa en cotiledones emergidas de semillas de soja peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con <i>M. phaseolina</i>	153
Figura 55. Plántulas de soja con crecimiento detenido/muertas en estado de cotiledón, emergidas de semillas peleteadas con endófitos, en sustrato inoculado con <i>M. phaseolina</i>	154
Figura 56. Síntomas de la podredumbre carbonosa. Detención de plántulas en estado de cotiledón.	155
Figura 57. Raíces de plántulas de soja necrosadas por <i>M. phaseolina</i>	155
Figura 58. Plántulas debilitadas, con cotiledones manchados, podredumbre basal y destrucción radicular en comparación con plántulas de tratamientos testigo. ..	156
Figura 59. Plántulas con podredumbre basal ocasionada por <i>M. phaseolina</i> en comparación con una plántula testigo.	156
Figura 60. Plántulas de soja débiles/más pequeñas/muertas emergidas de semillas de soja peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con <i>M. phaseolina</i> a los 21 días.....	157

RESUMEN

Los endófitos colonizan asintóticamente el interior de las plantas durante una parte o todo su ciclo de vida. Han sido encontrados en todas las especies vegetales estudiadas y en diferentes regiones climáticas del mundo, perteneciendo principalmente a especies fúngicas y bacterianas. Los endófitos pueden conferir beneficios a sus hospederos, como la protección frente a herbívoros y patógenos, adaptación a condiciones de estrés, promoción del crecimiento y activación de mecanismos de defensa. Los objetivos de este trabajo fueron: a) determinar las frecuencias de infección de los endófitos en plantas sanas de trigo y soja; b) analizar la existencia de variaciones cuali-cuantitativas en diferentes cultivares, diversos órganos, diferentes estadíos del ciclo fenológico y distintas campañas agrícolas; c) comparar la diversidad de las comunidades endófitas de ambos cultivos y d) evaluar la capacidad antagonista potencial de especies endófitas frente a *Pyrenophora tritici-repentis* y *Macrophomina phaseolina*, causantes de la mancha amarilla del trigo y de la podredumbre carbonosa de la soja, respectivamente. Para ello, se recolectaron muestras de plantas de trigo y soja de diferentes órganos, estadíos, cultivares y campañas agrícolas y se realizaron aislamientos en medio de cultivo artificial. Los endófitos aislados fueron identificados utilizando la metodología convencional sobre la base de sus características morfológicas y culturales. A fines de evaluar el potencial biocontrolador de los endófitos de cada hospedante se seleccionaron diferentes especies con las que se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo*. En trigo, las diferentes combinaciones *P. tritici-repentis*-endófitos se confrontaron en ensayos en laboratorio (cultivos duales y test de germinación de esporas) y ensayos en invernáculo, evaluando la reducción de la severidad de la mancha amarilla en plántulas. En soja, las combinaciones *M. phaseolina*-endófitos fueron confrontadas en pruebas en laboratorio (cultivos duales y un bioensayo con semillas peleteadas con endófitos sembradas en medio de cultivo colonizado por *M. phaseolina*) e *in vivo* sembrando semillas peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con el patógeno. Los resultados mostraron que el trigo y la soja hospedan comunidades conformadas por un gran número de especies fúngicas, cuya composición mostró depender del hospedante y de las condiciones ambientales. A su vez, las comunidades endófitas mostraron una dinámica espacial, evidenciada en las variaciones cuali-cuantitativas en los órganos y una dinámica temporal, demostrada con las variaciones cuali-cuantitativas de las especies a lo largo de los ciclos fenológicos de ambos cultivos. La mayoría de las especies aisladas en ambos hospedantes pertenecieron al Phylum Ascomycota, distribuidas mayoritariamente en las clases Dothidiomycetes y Sordariomycetes. La comparación de las comunidades endófitas de trigo y soja mostró que la riqueza específica en soja fue mayor, destacándose las hojas seguidas por los tallos para ambos hospedantes. Los índices de diversidad revelaron una

tendencia hacia una distribución equitativa de las especies aunque algunas fueron más abundantes según el hospedante y el órgano. La mayoría de los endófitos de trigo evaluados por su potencial biocontrolador frente a *P. tritici-repentis* redujo su crecimiento en los cultivos duales en comparación con el testigo, destacándose el efecto de *Trichoderma hamatum*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. y *Paecilomyces lilacinus*. A su vez, la mayoría de los endófitos ocasionó alteraciones morfológicas en los conidios y/o micelio del patógeno. *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp., redujeron significativamente el porcentaje de germinación de esporas del patógeno en comparación con el testigo. En el ensayo de invernáculo, *T. hamatum*, *Chaetomium globosum* y *Fusarium* sp. redujeron la severidad de la mancha amarilla en las hojas evaluadas. Se destaca a *T. hamatum* por efecto en la reducción de *P. tritici-repentis* y en la reducción de los síntomas de la mancha amarilla y a *Bacillus* sp. que antagonizó al patógeno en los ensayos *in vitro*. Todos los endófitos evaluados por su potencial biocontrolador frente a *M. phaseolina* redujeron su crecimiento en cultivos duales en comparación con el testigo, destacándose *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum*, los que a su vez ocasionaron alteraciones en las hifas del patógeno. En las pruebas *in vitro*, se destaca el comportamiento de *T. harzianum* (V5) y las dos cepas de *T. longibrachiatum* por mejorar significativamente el porcentaje de semillas germinadas y el largo de radícula en comparación con el testigo enfermo. En los bioensayos *in vivo* todos los endófitos mostraron efectividad en la protección frente a *M. phaseolina* al reducir la sintomatología de la podredumbre carbonosa. Las dos cepas de *T. longibrachiatum* mostraron buen comportamiento antagónico frente a *M. phaseolina*, sin embargo evidenciaron variaciones según las pruebas. Se destaca el efecto de *T. harzianum* (V5) que mostró buen efecto antagónico en cultivos duales, los mayores porcentajes de germinación en las pruebas *in vitro* e *in vivo* y en la protección de las plántulas frente a *M. phaseolina* y en la protección frente al avance de la enfermedad desde la emergencia hasta los 21 días. El presente estudio aporta al conocimiento de las comunidades endófitas asociadas al trigo y la soja en Argentina, su dinámica temporal y espacial. A su vez, se ha demostrado que endófitos aislados de estos hospedantes mostraron capacidad biocontroladora frente a *P. tritici-repentis* y *M. phaseolina* y en la reducción de la severidad de la mancha amarilla y la podredumbre carbonosa, respectivamente. Se destaca el efecto de *T. hamatum* frente a *P. tritici-repentis* y de *T. harzianum* frente a *M. phaseolina*. Los resultados promisorios obtenidos motivan la continuación de las investigaciones con miras a la inclusión de los endófitos como potenciales alternativas inocuas para el manejo integrado de ambas enfermedades.

ABSTRACT

Endophytes are microorganisms that colonize living internal tissues of plants without causing visible symptoms. Endophytes have been found in all plants studied in different climatic regions of the world and belong to the taxa of the fungi and bacteria. Endophytes have been shown to confer advantages to host plants such as tolerance to herbivory and adaptation to stress conditions. They can improve and promote growth of the host, activate host defense mechanisms as well as protect against phytopathogens. Therefore, the objectives of this work were a) to determine the infection frequencies of endophytes wheat and soybean plants; b) to analyze possible qualitative and quantitative changes of species isolated from different cultivars, and organs at different growth stages of wheat and soybean in two crop years; c) comparing the diversity of endophytic communities of wheat and soybeans and, d) to evaluate the antagonistic potential of endophytes against *P. tritici-repentis* and *M. phaseolina*, causing the tan spot of wheat and charcoal rot of soybean. Wheat and soybean plants were grown at the experimental field of the Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires. Samples of different organs, growth stages and crop years were collected and analyzed from symptomless plants by culturing surface-sterilized tissues in artificial media. Endophytes were identified on the basis of conventional cultural and morphological characteristics. To evaluate their potential as biocontrol agents against both pathogens, endophytes were selected and confronted in *in vitro* and *in vivo* assays. In wheat, endophytes were screened using dual culture techniques and the antifungal activity in greenhouse assays. In soybean, endophytes were confronted against *M. phaseolina* in dual culture and a bioassay using pelleted seed with endophytes grown in culture media colonized by *M. phaseolina*. Also, a bioassay *in vivo* sowing pelleted soybean seeds with endophytes on inoculated substrate was performed. The composition of the endophytic community varied with the host communities and environmental conditions however there were no differences in cultivars. Also, the communities showed temporal and spatial dynamics, evidenced with quali-quantitative variations in the organs and in the growth stages of the crop cycle. Most of the endophytes belonged to species of the Phylum Ascomycota, and were represented mainly by two classes, Dothidiomycetes and Sordariomycetes. The comparison of the endophytic communities in both hosts showed that the specific richness was highest in soybean than in wheat and within soybean in leaves followed by stems. The diversity index revealed a tendency to an equal distribution although some were markedly more abundant according to the host and organ. Most of the endophytes tested significantly reduced *P. tritici-repentis* growth compared to the control in dual cultures. *Trichoderma hamatum*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. and *Paecilomyces lilacinus* significantly reduced the colony diameter of the

pathogen. Most of the endophytes showed morphological changes in the conidia and/or the mycelia of *P. tritici-repentis*. *Bacillus* sp. and *Fusarium* sp., reduced significantly the percent of spore germination of the pathogen compared to the control. In greenhouse experiment *T. hamatum*, *Chaetomium globosum* and *Fusarium* sp. significantly reduced the disease severity on all three leaves assayed. However, the best antagonistic effect was shown with *T. hamatum* as it resulted in the greatest suppression in the greenhouse and in the dual-plate assays. Likewise, *Bacillus* sp. was other highlighted microorganism that antagonized the pathogen in *in vitro* assays. All endophytes evaluated for their biocontrol potential against *M. phaseolina* were effective on the reduction of the pathogen in dual culture compared with the control, highlighting the effect of *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* and *T. longibrachiatum*. The endophytes that significantly reduced the colony diameter of the pathogens also caused morphological changes on the mycelia. *T. harzianum* (V5) and *T. longibrachiatum* improved the percentage of germination and the length of the seedling radicle in *in vitro* assays compared with the control. According to the *in vivo* assays, although some variations were observed in the results, all endophytes were effective in protecting against *M. phaseolina* reducing the symptomatology of charcoal rot disease on seedlings. In this assay, *T. harzianum* (V5) was the more effective endophyte to improve the percentage of germination and to protect against charcoal rot disease. The study of the endophytic wheat and soybean diversity contributes to the knowledge of their specific communities and their spatial and temporal dynamics in cultivars growing in environmental conditions of our region as well as demonstrates that endophytes isolated from these hosts were effective in the biocontrol of *P. tritici-repentis* and *M. phaseolina* and in the reduction of the severity of the tan spot and charcoal rot. According to the results obtained in this work further research for the inclusion of these endophytes as safe potential alternatives in an integrated management of these diseases is suggested.

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL

1. LOS MICROORGANISMOS ENDOFITOS

Desde el punto de vista biológico, una planta es considerada una comunidad compleja colonizada externa e internamente por una diversidad de microorganismos patógenos, epífitos, endófitos, saprófitos y micorrizas (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). El término “endófito” (*endon*= dentro, *phyton*= planta) ha sido definido por el botánico alemán Anton de Bary (1886) haciendo referencia a aquellos microorganismos que colonizan internamente los tejidos de hojas y tallos. Esta definición fue posteriormente revisada, especificándose que las infecciones ocasionadas por los endófitos son asintomáticas y que también pueden colonizar raíces y brotes. Esta nueva definición aborda un enfoque hacia la interacción entre endófitos y hospedantes, diferenciando entre relaciones simbióticas o mutualistas e incorporando a microorganismos que no persisten todo su ciclo de vida como endófitos (Carroll, 1988; Petrini, 1991; Wilson, 1995; Stone *et al.*, 2004). En la actualidad, la definición comúnmente hace referencia a todos aquellos microorganismos que viven asintomáticamente en el interior de las plantas, principalmente bacterias y hongos, colonizando células y tejidos sanos de diferentes órganos durante una parte o todo su ciclo de vida (Dalal y Kulkarni, 2014a; Gomes Fernandes *et al.*, 2015). Dentro de esta amplia definición se incluyen a los *patógenos latentes*, definidos como aquellos que viven asintomáticamente en los tejidos del hospedante durante un tiempo conocido como “período latente”, el cual persiste hasta que por condiciones ambientales o nutricionales, o por el estado de madurez de la planta o del patógeno, se manifiestan síntomas y/o signos característicos de la enfermedad (Petrini, 1991; Sinclair, 1991; Bacon y White, 2000). También se incluyen en esta definición a los microorganismos *saprófitos latentes* que colonizan los tejidos vivos, sin embargo, crecen rápidamente cuando sobreviene la senescencia del órgano o planta hospedera (Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

Se ha demostrado que los endófitos pueden ser cepas avirulentas de patógenos, patógenos de otros hospedantes, los cuales son no patogénicos en su relación endofítica, patógenos débiles o poco competidores con otras especies, saprófitos latentes y los ya mencionados patógenos latentes (Luginbuhl y Müller, 1980; Carroll y Petrini, 1983; Sieber *et al.*, 1988; Petrini *et al.*, 1992; Arnold, 2007; Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

Los estudios de los endófitos comenzaron a despertar interés en el año 1975 a partir del descubrimiento de la presencia de hongos asociados a la festuca alta (*Festuca arundinacea* L.) y al raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) y su relación con la toxicidad en ganado (Bacon *et al.*, 1977). Estudios realizados por diferentes investigadores demostraron la existencia de asociaciones entre el hongo endófito *Epichloë coenophiala* (Morgan-Jones & Gams) Bacon & Schardl, comb. nov. (= *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones &

Gams) Glenn, Bacon & Hanlin) y la festuca alta y de *E. festucae* Leuchtm., Schardl & Siegel var. *lolii* (Latch, Christensen & Samuels) Bacon & Schardl, stat. nov. et comb. nov. (= *Neotyphodium lolii*) y el raigrás perenne (Clay, 1988; White, 1988; White *et al.*, 2000; Leuchtmann *et al.*, 2014).

Estas asociaciones fueron las más ampliamente estudiadas por su importancia tanto económica, debido a su efecto en los animales, como ecológica desde los trabajos realizados por Clay (1988) quien sugirió que estos hongos asintomáticos proporcionan protección a sus hospedantes. Una gran cantidad de información se generó en relación a los endófitos de gramíneas o pastos, haciendo especial referencia a aquellas asociaciones que se establecen entre gramíneas de la subfamilia *Pooideae* y hongos del género *Epichloë* (familia *Clavicipitaceae*), también conocidos como “endófitos clavicipitaceos”. Se ha demostrado que varios metabolitos secundarios producidos por estos hongos, en su mayoría alcaloides, son los causantes de la toxicidad en animales así como de efectos benéficos en sus hospedantes, y que su producción depende del genotipo del hospedante, de las diferentes interacciones endófito-hospedante y de las condiciones ambientales (Bacon *et al.*, 1977; Kuldau y Bacon, 2008, Iannone, 2014).

Los endófitos de gramíneas fueron clasificados por Clay y Schardl (2002) en tres grupos en los que incluyeron las especies patogénicas o capaces de ocasionar sintomatología en el hospedante, especies que pueden ser asintomáticas y patogénicas y especies asintomáticas (Tipos I, II y III, respectivamente). Los hongos endófitos *E. coenophiala* y *E. festucae* var. *lolii* fueron incluidos dentro del Tipo III, los cuales se caracterizan por formar infecciones sistémicas asintomáticas creciendo intercelularmente en los tejidos vegetativos (vainas y tallos, principalmente) hacia las inflorescencias, alojándose en los óvulos y de esta manera son transmitidos verticalmente a través de las semillas. Estos endófitos son considerados “obligados” dado que dependen del hospedante para su sobrevivencia y crecimiento. En estas asociaciones, las plantas colonizadas hospedan una especie endófito dominante, con las que mantienen una relación simbiótica mutualista en la cual el hongo encuentra un medio para vivir y dispersarse proporcionándole al hospedante algún tipo de beneficio (Wille *et al.*, 1999). Entre éstos, pueden mencionarse la protección frente a patógenos (Burpee y Bouton, 1993; Yue *et al.*, 2000; Vignale *et al.*, 2013) y herbívoros (insectos, nematodos y mamíferos) (Li *et al.*, 2004; Tintjer y Rudgers, 2006), la estimulación en la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (aumento de biomasa) (Iannone *et al.*, 2012b) e incremento su sobrevivencia frente a condiciones de estrés, tales como la tolerancia a la sequía (Rodríguez *et al.*, 2009; Gond *et al.*, 2010) y a su vez, algunos pueden inducir la activación de los mecanismos de defensa de su hospedero generando resistencia sistémica adquirida (Bultman y Murphy, 2000).

Los endófitos de gramíneas o pastos son estudiados en diferentes regiones del mundo (Kaldau y Bacon, 2008; Cargo *et al.*, 2014; Iannone *et al.* 2012a) sin embargo, desde el año 1991 comenzó a generarse un gran interés por los microorganismos endófitos de otros hospederos o “endófitos no clavicipitaceos”, con trabajos pioneros como los de Carroll (Carroll y Carroll, 1978; Carroll, 1988), Fisher (Fisher *et al.*, 1986), Petrini (Petrini *et al.*, 1979; 1982), Sieber (Sieber, 1989), entre otros, quienes mayoritariamente se enfocaron en el estudio de endófitos fúngicos de árboles y arbustos. A partir de ese año, diversos autores realizaron contribuciones analizando las comunidades endofíticas de diversas especies vegetales, su abundancia, modelos de colonización, interacciones con sus hospedantes, su taxonomía y su rol ecológico (Carroll, 1992; Fisher *et al.*, 1995; Petrini *et al.*, 1992; Schulz y Boyle 2005; Arnold, 2007; Arnold *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009).

Hasta la fecha, los endófitos han sido encontrados en todas las especies vegetales herbáceas, árboles, algas, musgos y helechos de las diferentes zonas tropicales, templadas, desérticas o boreales del mundo (McInroy y Kloeper, 1991; Petrini, 1991; Cabral *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 1993; Gasoni y Stegman de Gurfinkel, 1997; Schulz *et al.*, 1998; Fröhlich *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2000; Larran *et al.*, 2000; 2001; Bussaban *et al.*, 2001; Dingle y McGee, 2003; Schulz y Boyle, 2005; Arnold y Lutzoni, 2007; Higgins *et al.*, 2007; Gomes Fernandes *et al.*, 2015).

Si bien frecuentemente se aíslan endófitos fúngicos de los tejidos vegetales, de casi todos los hospedantes estudiados se han aislado bacterias endófitas a partir de frutos, semillas de cereales, especies herbáceas y de raíces, tallos y hojas de especies leñosas (Chanway, 1998; Hallman *et al.*, 1997; Marquez-Santacruz *et al.*, 2010; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Entre los géneros encontrados se pueden mencionar *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Serratia* y *Clavibacter*, siendo los tres primeros los más comúnmente aislados (Chanway, 1998; Hallman *et al.*, 1997; Sturz *et al.*, 1998; Zinniel *et al.*, 2002). Diversos autores han demostrado que las bacterias endófitas tienen su origen a partir de semillas, de material de plantación, del filoplano y principalmente de la rizosfera (Sturz, 1995; Pleban *et al.*, 1995). Ingresan al hospedante por estomas, lenticelas, radículas durante la germinación, heridas ocasionadas por daños, insectos, entre otros, y heridas naturales como resultado del crecimiento de la planta (ej. zonas de emergencia de raíces secundarias), pelos radiculares y por la coyuntura de las células de la epidermis a medida que crecen las raíces. Luego, pueden colonizar un tejido específico, como el cortex radicular o colonizan sistémicamente transportándose a través de elementos de conducción o del apoplasto y con menor frecuencia, intracelularmente y por tejidos vasculares, sin causar síntomas de enfermedad (Hurek *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1995; Hallmann *et al.*, 1997). Así como en las infecciones fúngicas endofíticas, las bacterias pueden colonizar tejidos en forma neutral o en asociaciones mutualistas, incluyéndose

aquellas que son especies saprófitas pero que durante un período viven endofíticamente (Kobayashi y Palumbo, 2000). Las mayores poblaciones de bacterias se han encontrado en raíces y en menor cantidad en tallos disminuyendo acropetamente (McInroy y Kloepper, 1995). Son afectadas por factores bióticos (como las interacciones con otros microorganismos, como otros endófitos y patógenos) y factores abióticos como temperatura, precipitaciones, factores edáficos, entre otros) (Hallman *et al.*, 1997).

Las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento y producción de las plantas, inducir resistencia sistémica adquirida y actuar como agentes de biocontrol frente a patógenos (Hallman *et al.*, 1997). Asimismo, se ha demostrado que éstas tienen un rol en la fitoremediación de suelos, removiendo contaminantes, y en la fertilidad a través de su participación en la solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno (Newman y Reynolds, 2005; Rosenblueth y Martínez-Moreno, 2006; Ryan *et al.*, 2008; Gaiero *et al.*, 2013).

Diversos autores han reportado la presencia de levaduras endófitas en tejidos asintomáticos de arroz (*Oryza sativa* L.) (Tian *et al.*, 2004), banana (*Musa acuminata* Colla) (Pereira *et al.*, 1999), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Larran *et al.*, 2002a; Larran *et al.*, 2007), soja (Larran *et al.*, 2002b), maíz, sauces, pinos y robles (Doty, 2013). Sin embargo, en comparación con la amplia bibliografía existente de hongos filamentosos y bacterias endófitas, son escasos los estudios de diversidad y aplicaciones de las levaduras endófitas. Esto a su vez es coincidente con la baja proporción con que estos microorganismos son registrados en los hospedantes estudiados.

Haciendo especial referencia a los endófitos fúngicos, estos microorganismos son considerados ubicuos por su amplia distribución y riqueza en los distintos tipos de tejidos de numerosos hospedantes (Arnold *et al.*, 2000; Arnold, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009; Porras y Bayman, 2011). Algunos micólogos consideran que los hongos endófitos “no clavicipitaceos” son un grupo altamente diverso (polifilético), el cual constituye un componente importante de la biodiversidad fúngica. La mayoría de ellos pertenece principalmente al Phylum Ascomycota y en menor proporción al Phylum Basidiomycota difiriendo no solo taxonómicamente sino también ecológicamente de los “endófitos clavicipitaceos” de gramíneas (EC) (Petrini *et al.*, 1992; Clay y Schardl, 2002; Arnold y Herre, 2003; Rodríguez *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que las comunidades endofíticas son “específicas de un hospedante” (Luginbuhl y Müller, 1980; Bertoni y Cabral, 1988; Petrini y Fisher, 1988; Sieber *et al.*, 1988; Sieber *et al.*, 1991; Petrini *et al.*, 1992) y que incluyen una mezcla de especies comunes o generalistas (capaces de infectar a diferentes hospedantes) y especies menos frecuentes de las cuales es difícil establecer su especificidad o si están relacionadas a las condiciones geográficas o ambientales (Petrini *et al.*, 1992; Kobayashi y Palumbo, 2000; Arnold, 2007). Generalmente, son aisladas un gran número de especies de los tejidos de un

hospedante sin embargo, muy pocas están en cantidades significantes, siendo consideradas especies dominantes. Estas especies, de acuerdo a lo sugerido por Petrini *et al.* (1992), estarían adaptadas a la forma de vida endofítica, distribuyéndose ampliamente dentro del hospedante y podrían ser obtenidas a partir del muestreo de pocos individuos de un mismo hospedante.

Asimismo, los diferentes órganos vegetales (hojas, raíces, tallos, flores, frutos, madera) de un mismo hospedante difieren en las comunidades fúngicas endofíticas que hospedan (Petrini *et al.*, 1992; Tejesvi *et al.*, 2005; Arnold, 2007; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011), demostrándose para algunos endófitos “órgano-especificidad”, ésto es, que colonizan un órgano en particular, pudiendo estar adaptados a las condiciones microecológicas y fisiológicas presentes en ese órgano, tal el caso de los endófitos radicales septados oscuros (DSE) (Petrini *et al.*, 1992; Petrini, 1996; Arnold, 2007; Zabalgozcoa, 2008).

De los tejidos aéreos, las hojas han sido los órganos más estudiados y en los cuales se ha encontrado una alta diversidad de hongos endófitos así como comunidades endofíticas diferentes en distintas hojas del mismo hospedante (Arnold *et al.*, 2000; Arnold y Herre, 2003). En este sentido, una hoja ha sido considerada “un denso mosaico de diversas especies” que puede contener hasta una docena de especies por cada 2 mm² de tejido (Gamboa *et al.*, 2002).

Las evidencias indican que la mayoría de los endófitos no clavicipitaceos estudiados son transmitidos horizontalmente, si bien existen excepciones que se transmiten verticalmente a través de las semillas como *Phomopsis castanea* en plantas de castaña (Washington *et al.*, 1999; Arnold, 2007).

Hasta la actualidad, los modelos de colonización de la microbiota endofítica en el hospedante se han estudiado escasamente, si bien es sabido que las infecciones que generan pueden ser localizadas o sistémicas (Cabral *et al.*, 1993; Arnold y Herre, 2003). Debido a la característica de estos hongos de transmitirse horizontalmente, las esporas o fragmentos de hifas que son liberadas al aire y transportados por insectos, viento, lluvia, en condiciones de alta humedad y mojado de las hojas producen una rápida penetración y colonización. Las esporas germinan sobre la superficie de los tejidos del hospedante, ingresan mayoritariamente a través de partes aéreas (tallos, cotiledones, hojas, flores, etc.) y en menor proporción a través de las raíces, por los estomas, la cutícula o por inoculación de esporas a través de insectos (Bernstein y Carroll, 1977; Petrini, 1991). La colonización interna de tejidos puede ser intercelular y en este tipo puede ser limitada a la cámara subestomática o los espacios intercelulares del mesófilo e intracelular, limitada a una sola célula o colonizando más células (Cabral *et al.*, 1993). Por su parte, el ingreso de las levaduras al hospedante todavía sigue siendo incierto, sugiriéndose que podrían ingresar

por estomas o heridas o a través de la producción de enzimas que utilizarían para la penetración (Doty, 2013).

La estructura de la comunidad endofítica de un hospedante, o sea la diversidad específica representada por la riqueza y la abundancia relativa, está influenciada por el hospedante, el microhabitat (tejido colonizado), las estaciones del año, edad de los tejidos del hospedante, por las condiciones ambientales, por la interacción con microbiomas internos o externos (hongos de suelo, epífitos, endófitos de raíces) y por las interacciones de los microorganismos con el hospedante (Arnold, 2007; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011; Gaiero *et al.*, 2013). Por lo tanto, las comunidades endofíticas de las plantas son altamente dinámicas mostrando importantes variaciones en un mismo hospedante en diferentes sitios, climas, estaciones y condiciones ambientales (Gamboa *et al.*, 2002). Se ha encontrado una relación positiva entre la riqueza y/o frecuencia de colonización y la edad de los tejidos así como cambios en la diversidad en la distribución diferencial de algunas especies en hojas jóvenes y adultas (Espinosa-García y Langenheim, 1990). También se han reportado cambios sucesionales de las comunidades con el avance de la senescencia de tejidos (Petrini *et al.*, 1992). La diversidad de estos endófitos sigue un gradiente latitudinal con altos valores en los trópicos en relación a las tundras árticas o forestaciones boreales así como efectos en la diversidad en climas templados (Arnold y Lutzoni, 2007).

En relación al rol de los endófitos en la naturaleza, muchos autores sugieren que las asociaciones simbióticas hongo-hospedante pueden tener un importante impacto en la ecología, adaptación de los hospedantes y en su evolución (Bundrett, 2006; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Las primeras evidencias de los efectos de los hongos endófitos en la protección de las plantas frente a insectos herbívoros fue documentada en 1981 generando el interés por el estudio del rol de estos microorganismos (Webber, 1981). Algunos autores sostienen que varios aspectos de la sanidad de los hospedantes podrían depender de la composición de la microbiota endofítica y a su vez afectarla. Estos estudios interdisciplinarios aproximan información acerca del rol de las comunidades endofíticas en la adaptación de las plantas, evolución y respuesta a los cambios climáticos (por ejemplo, altas temperaturas proporcionando termotolerancia, sequía, aumentos en cantidad de dióxido de carbono, salinidad, entre otras) (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). En la actualidad, se ha demostrado que las asociaciones endófito-hospedante contribuyen con múltiples beneficios tales como incrementar la resistencia frente a insectos y patógenos, inducción de respuestas sistémicas de defensa en las plantas (Dingle y McGee, 2003; Sumarah *et al.*, 2010; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011) y en la promoción del crecimiento, acelerando la emergencia de semillas, promoviendo el establecimiento de plantas y/o incrementando el crecimiento y desarrollo de las mismas (Pillay y Nowak, 1997; Bacon y White, 2000). También se ha demostrado que algunos endófitos pueden contribuir en la fitorremediación de suelos removiendo

contaminantes e incrementando la tolerancia a estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2012; Barrow *et al.*, 2008).

2. LA MICROBIOTA ENDOFITICA Y EL CONTROL BIOLÓGICO

Los sistemas agrícolas mundiales afrontan el desafío de asegurar las demandas de productos agropecuarios de la creciente población humana, para lo cual en la actualidad disponen de paquetes tecnológicos que favorecen el aumento de los rendimientos, tales como semillas mejoradas biotecnológicamente, maquinaria agrícola especializada con sistemas de posicionamiento global (GPS), riego, entre otras. Sin embargo, una de las limitantes más importantes del rendimiento y calidad de los cultivos son las enfermedades de las plantas para lo cual la estrategia más utilizada para su manejo desde el año 1950 es el uso de productos fitosanitarios (FAO, 1997). Su utilización si bien constituye un aporte fundamental a la reducción de las pérdidas causadas por los patógenos y, por lo tanto a los rendimientos, su uso masivo como medida de protección de cultivos y control de los fitopatógenos ha generado impactos perjudiciales tales como resistencias a diferentes grupos de fungicidas, toxicidad para el hombre y animales, contaminación ambiental (suelo, aire y agua), pérdida de biodiversidad y destrucción de la fauna benéfica (Crowder y Jabbour, 2014). Por lo cual, en la actualidad, en el marco de una agricultura sustentable y amigable con el ambiente, el manejo integrado de enfermedades juega un rol preponderante. En este sentido, la búsqueda de alternativas inocuas para su control constituye un importante desafío para la producción de alimentos sanos y, en forma rentable, bajo un nuevo paradigma productivo. El manejo integrado surge como un nuevo modelo agroecológico cuyo objetivo es la reducción de los daños ocasionados por las enfermedades a niveles tolerables utilizando diferentes estrategias combinadas, tales como métodos físicos, químicos, culturales, biológicos y genéticos.

El control biológico ha demostrado ser una herramienta viable y necesaria como parte de un manejo integrado de las enfermedades, por lo que ha tenido un desarrollo sostenido durante las últimas décadas (Dal Bello y Mónaco, 2014). A diferencia del uso de los productos fitosanitarios, el biocontrol busca la reducción de la intensidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno que produce la enfermedad, mediante la manipulación del ambiente, del hospedante o de los antagonistas del patógeno que se quiere controlar, de acuerdo a la definición de Baker y Cook (1974). Los antagonistas son agentes biológicos naturales o genéticamente modificados que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos sobre la superficie del hospedante, en la

entrada al hospedantes y en la transmisión del patógeno entre las plantas (Dal Bello y Mónaco, 2014). Los sistemas de aplicabilidad de estos antagonistas son el método clásico, en el que los antagonistas se obtienen de su medio natural, el conservador, que consiste en favorecer la abundancia de los antagonistas naturales de patógenos de enfermedades a través de la manipulación del ambiente y el aumentativo, el cual involucra la introducción o liberación a gran escala de biocontroladores en forma repetida sobre el objetivo a controlar (Ezzyyani *et al.*, 2006).

Los mecanismos de acción utilizados por los agentes de control biológico pueden ser antagonismo directo a través de antibiosis, competencia por nutrientes o nichos ecológicos y el parasitismo o lisis del agente patógeno; y antagonismo indirecto, en este caso, mediado por el hospedante alterando la fisiología de la planta aumentando su capacidad de resistencia al ataque del patógeno, lo cual se denomina protección sistémica o resistencia inducida (Alabouvette *et al.*, 2009; Camarena-Gutierrez y de la Torre-Almaráz, 2007; Martínez *et al.*, 2013.; Dal Bello y Mónaco, 2014; Stocco, 2014). Asimismo, algunos agentes de biocontrol son capaces de promover el crecimiento de la planta fortaleciendo sus sistemas naturales de defensa como la producción de fitohormonas que promueven el desarrollo radicular (ej. bacterias del género *Azospirillum*) (Ferlini *et al.*, 2005). Los antagonistas más utilizados en el manejo integrado de enfermedades pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* los que son aplicados por pulverización sobre el follaje o como cobertura de las semillas (pelleteado o pildorización) (Ezzyyani *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013; Dal Bello y Mónaco, 2014; Stocco, 2014). Interesantemente, algunas especies pertenecientes a estos géneros han sido citados como microorganismos endófitos de diferentes hospedantes (Larran *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008; Bacon y Hinton, 2011).

Se ha demostrado que algunos endófitos colonizan los mismos nichos ecológicos que ocupan los patógenos y que a su vez, coexisten e interactúan en los tejidos de las plantas por lo que se considera que desempeñan una importante labor fisiológica y ecológica en el biocontrol de patógenos (Stone y Petrini, 1997; Narisawa *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Dingle y McGee, 2003; Istifadah y McGee, 2006; Zabalgoceazcoa, 2008). En este contexto, algunos endófitos fúngicos entre los que se pueden mencionar pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Beauveria*, *Chaetomium* y *Phoma* han sido documentados como efectivos agentes de biocontrol frente a numerosos patógenos incluyendo hongos, bacterias y virus (Dingle y McGee, 2003; Istifadah y McGee, 2006; Gond *et al.*, 2010; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011).

Los mecanismos que utilizan los hongos endófitos en el biocontrol son algunos de los mencionados para los microorganismos biocontroladores más estudiados, tales como acción

directa sobre el patógeno (parasitismo), competencia por nutrientes o nichos y antibiosis o producción de metabolitos secundarios (ej. alcaloides, terpenoides, flavonoides, citocalacinas policétidos y esteroides) y antagonismo indirecto, por la inducción de defensas en el hospedante, por estimulación en el crecimiento o vigor de la planta, o por producir elicitores que estimulan a la planta a producir metabolitos secundarios que actúan sobre los patógenos (Alabouvette *et al.*, 2009; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Cada uno de los endófitos puede utilizar uno o varios de estos mecanismos al interactuar con los patógenos, teniendo el grado de predominancia de estos mecanismos consecuencias para la ecología evolutiva de las relaciones huésped-endófito-patógeno (Arnold, 2007).

Los estudios hasta el presente han demostrado efectos antagónicos entre endófitos y patógenos en diferentes patosistemas reduciendo la incidencia o severidad de enfermedades en distintos hospedantes, entre los que se mencionan la supresión de *Verticillium dahliae*, agente causal del marchitamiento en berenjenas (*Solanum melongena* L.) por un endófito radicular (Narisawa *et al.*, 2002), reducción de pérdidas ocasionadas por *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora* por el endófito *Colletotrichum gloeosporioides* en plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Mejía *et al.*, 2008), reducción del oídio ocasionado por *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* en cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Vilich *et al.*, 1998), reducción del carbón ocasionado por *Ustilago bullata* en cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trin.) por endófitos del género *Epichloë* (Vignale *et al.*, 2013) y reducción del carbón ocasionado por *Ustilago maydis* en maíz (*Zea mays* L.) por el endófito *Fusarium verticillioides* (Lee *et al.*, 2009).

Asimismo, los hongos endófitos han cobrado importancia por los metabolitos secundarios que producen, los cuales pueden ser utilizados en agricultura, medicina e industria tales como antibióticos, antimicóticos, inmunosupresores, compuestos anticancerígenos, entre otros (Strobel y Daisy, 2003). La producción de metabolitos secundarios por endófitos fúngicos ha demostrado toxicidad frente a nemátodos y patógenos de suelo (Hallman y Sikora, 1996). En estudios *in vitro* se ha demostrado el potencial antimicrobiano de los endófitos frente a patógenos a través de la producción de metabolitos secundarios como por ejemplo, el cryptocin producido por *Cryptosporiopsis quercina* y la producción del ácido colletotrico producido por *Colletotrichum gloeosporioides*, ambos con fuerte actividad antimicótica frente a *Pyricularia oryzae* (Li *et al.*, 2000) y a *Bipolaris sorokiniana*, respectivamente (Zou *et al.*, 2000).

Si bien existen numerosos estudios hasta la fecha acerca del rol de los endófitos, resta aún por esclarecer diversos aspectos tales como su distribución en la naturaleza como componentes de los agroecosistemas (ya que existen en una gran diversidad de especies vegetales), su ubicuidad (gran diversidad en los hospedantes) y en particular, su rol la reducción de las enfermedades.

En el marco de una producción agrícola sustentable comprometida a incrementar su producción, los endófitos fúngicos podrían tener un importante rol en la reducción de las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de los cultivos ofreciendo una alternativa amigable con el medioambiente que incluya el uso criterioso de los productos fitosanitarios. En este contexto, demostrados los resultados promisorios de las investigaciones realizadas hasta el presente, surge el interés por el estudio de la microbiota endofítica en particular, su diversidad y dinámica y su potencial para reducir enfermedades de importancia en cultivos significativos en las regiones productoras de nuestro país como son el trigo y la soja.

3. EL CULTIVO DE TRIGO Y DE LA SOJA

En el contexto mundial, los granos y sus subproductos constituyen un importante grupo de alimentos indispensables para la nutrición humana y animal, aportando proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Comercialmente el término “granos” es utilizado para designar tanto a los cereales como a las oleaginosas anuales. En Argentina, la comercialización de granos es una de las actividades tradicionales y más importantes, pudiéndose destacar al trigo y la soja entre los cereales y oleaginosas de mayor relevancia en cuanto a valores de producción y comercialización.

3.1. Trigo: Importancia del cultivo

El trigo es uno de los principales cereales, siendo cultivado en un 20% de las tierras del mundo, concentrando la mayoría de la producción entre los 30 y 60° latitud Norte y los 27 y 40° de latitud Sur. Es una de las especies vegetales más consumida en el mundo junto con el arroz, el maíz y la papa (FAO, 2015). El principal producto obtenido a partir del grano es la harina, obteniéndose también sémola y almidón, este último utilizado en la industria del papel y en la obtención de alcohol (Satorre *et al.*, 2010). Alrededor del 75% de la producción mundial del trigo es consumido por el hombre, constituyendo el 20% de las calorías que requiere la población mundial (Rajaram, 2001). La composición química de los granos de trigo está representada por contenidos en hidratos de carbono entre un 70 y 80%, aceite entre 1.5 a 2% y entre un 8 y 18% de proteínas, porcentajes que varían entre los s cultivares y determinan el valor económico y la calidad de los productos obtenidos a partir de los granos (Satorre *et al.*, 2010).

Considerando los últimos 45 años puede observarse una tendencia creciente en los valores de producción de trigo en el mundo sustentado principalmente en los aumentos de

rendimiento. Esto es consecuencia de la aparición de nuevos materiales, producto del mejoramiento genético, de la aplicación de técnicas de manejo eficientes de fertilización, mejoras en la tecnología de siembra y eficiencia de cosecha, manejo de los barbechos, sistemas de laboreo como la siembra directa, etc. que han incrementado la producción. Por el contrario, el área sembrada de trigo a nivel mundial ha variado muy poco en los últimos años ubicándose en la actualidad en 220 millones de hectáreas (Mha) con un rendimiento promedio de alrededor de 2800 kg/ha y una producción mundial de 727.87 millones de toneladas (Mt) (BCR, 2016). Esta tendencia positiva en la producción de trigo es debida a que el consumo de este cereal está íntimamente relacionado con el crecimiento de la población (Rajaram, 1999). Puede mencionarse que entre los años 1997 y 1999 representó el 31% del consumo mundial de cereales. El consumo de trigo *per cápita* en los países en desarrollo, ha seguido creciendo y con perspectivas futuras de mayores demandas por lo que muchos de estos países podrían depender de las importaciones (FAO, 2015).

En nuestro país, el trigo junto al cultivo de soja en rotación lidera históricamente el sistema agrícola más extendido del país y se destaca por su importancia en la recuperación de los nutrientes del suelo y asegurar su potencialidad (Barberis, 2016). En Argentina, el trigo ocupa el décimo tercer lugar con una producción de 13.93 Mt y una participación en la producción mundial del 1.91%, si bien se espera un leve aumento en la producción debido a la expectativa de aumento de superficie cosechada para las próximas campañas (USDA, 2016) (Figura 1).

El consumo mundial, por su parte, en los últimos años ha variado levemente con valores de 679.03, 698.36 y 705.43 Mt, para las campañas que van desde el 2012/2013 al 2014/2015 lo que conduce a valores de stocks mundiales que se vienen recuperando lentamente con 177.03, 194.03 y 214.51 Mt, respectivamente para las campañas mencionadas (USDA, 2016).

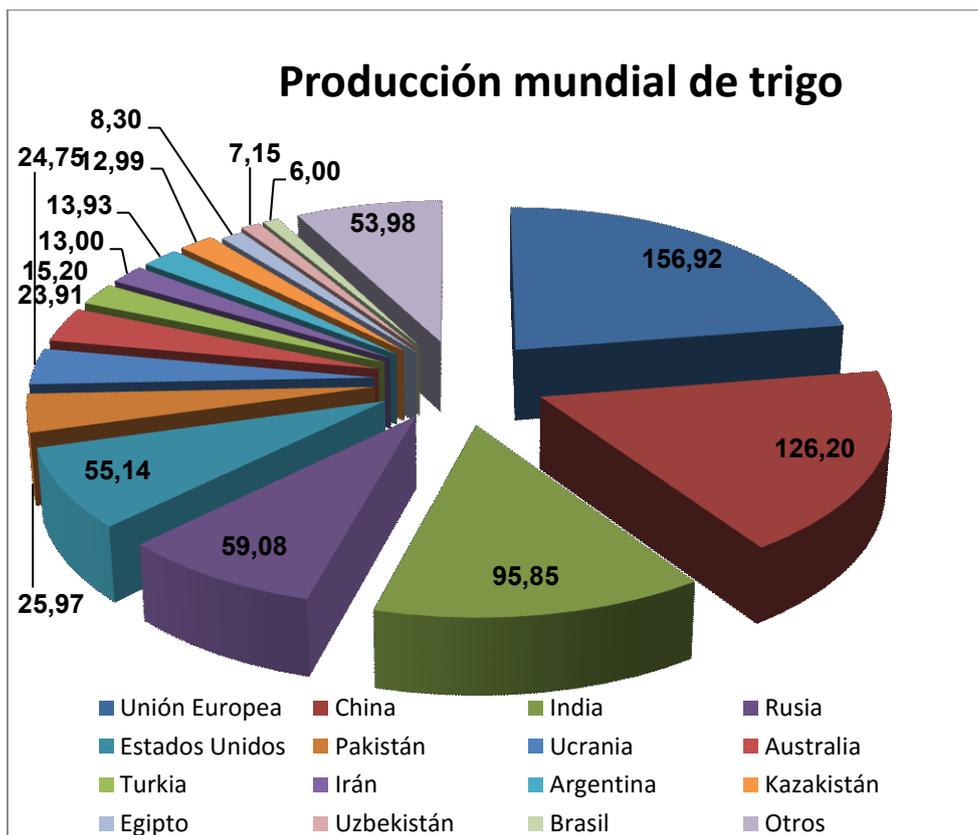


Figura 1. Producción mundial de trigo (Mt).

(Fuente: Elaboración propia: en base a datos del USDA, 2016).

La participación de nuestro país en las exportaciones mundiales ha mostrado un descenso importante en los últimos años principalmente debido a los cupos de exportación y a las alícuotas de los derechos de exportación impuestos a este cereal. En este sentido, se observó un descenso desde valores de 11.95 a 1.67 Mt, entre las campañas 2011/12 a 2013/14, recuperándose para la campaña 2014/15 con valores de 4.20 Mt y con expectativas de continuar este aumento hacia las próximas campañas por la baja realizada recientemente en las retenciones a la exportación (USDA, 2016).

La superficie sembrada con trigo por su parte ha sufrido una reducción desde la campaña 1996/97 con valores de 7.36 Mha para ese año, 5.21 Mha para 2005/2006, alcanzando un mínimo histórico en la campaña 2012/13 con 3.36 Mha, mostrando luego una recuperación en los siguientes años con valores de 4.40 Mha y una producción total de 12.50 Mt para la campaña 2014/15 (USDA, 2016; BCR, 2016). Los rendimientos promedio en nuestro país oscilan alrededor de los 2850 kg/ha, con algunos años que han superado los 3200 kg/ha, especialmente provenientes de la zona sudeste de Buenos Aires. Entre las causas de las reducciones en la superficie sembrada pueden mencionarse los ya mencionados cupos a las exportaciones de este cereal, las retenciones impuestas, un bajo

precio internacional, condiciones climáticas variables desfavorables para la producción del cultivo y la competencia actual por superficie con la cebada, debido a su buen precio, a la demanda de las malterías del país y del mundo, a su ciclo más corto de cultivo y a su fuerte crecimiento iniciado por no tener cupos ni retenciones a la exportación. Así puede mencionarse el incremento de la superficie sembrada con cebada entre 1985 y 2002 en alrededor de un 530% (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, 2014).

Como resultado del procesamiento del grano de trigo surgen dos ramas de productos, los de primera industrialización, entre los que se encuentra la harina, y los de segunda industrialización, los panificados, las pastas y las galletitas y bizcochos. Desde fines de los '90 hasta el año 2006, el 34% de la producción del país se destinaba a consumo interno exportándose el 66% restante, procesando la industria harinera 4.8 Mt por año. A partir del 2007, al reducirse las exportaciones y la producción se incrementa el trigo destinado al mercado interno (molinos harineros), llegando en la actualidad aproximadamente a 6 Mt. De la harina obtenida, 0.75 Mt se exportan y 4.6 Mt se destinan a la producción de derivados (panificación (73%), harina fraccionada (10%), pastas secas (8%), pastas frescas (2%) y galletitas (7%) (Barberis, 2014).

3.1.1. Subregiones ecológicas de la región triguera Argentina

La región triguera tradicional abarca la región comprendida entre los 31° y 40° de latitud Sur y los meridianos 58° y 66° de longitud Oeste de Greenwich si bien se extiende desde los 25° latitud Sur, incluyendo la zona de Chaco y Formosa, hasta los 40°, con los departamentos de Patagones y Villarino. El régimen térmico le confiere a la región la condición de ser una superficie de gran potencial productivo de granos con un período libre de heladas de 180 a más de 300 días. Asimismo, la superficie cultivada con trigo está ubicada entre las isohietas de 700 a 900 mm de precipitaciones anuales y en la zona semiárida, entre las de 700 y 400 mm anuales (Calzolari *et al.*, 2008). Dentro de la región triguera se distinguen las siguientes subregiones ecológicas: I, II Norte y II Sur, III, IV, V Norte y V Sur (Figura 2).

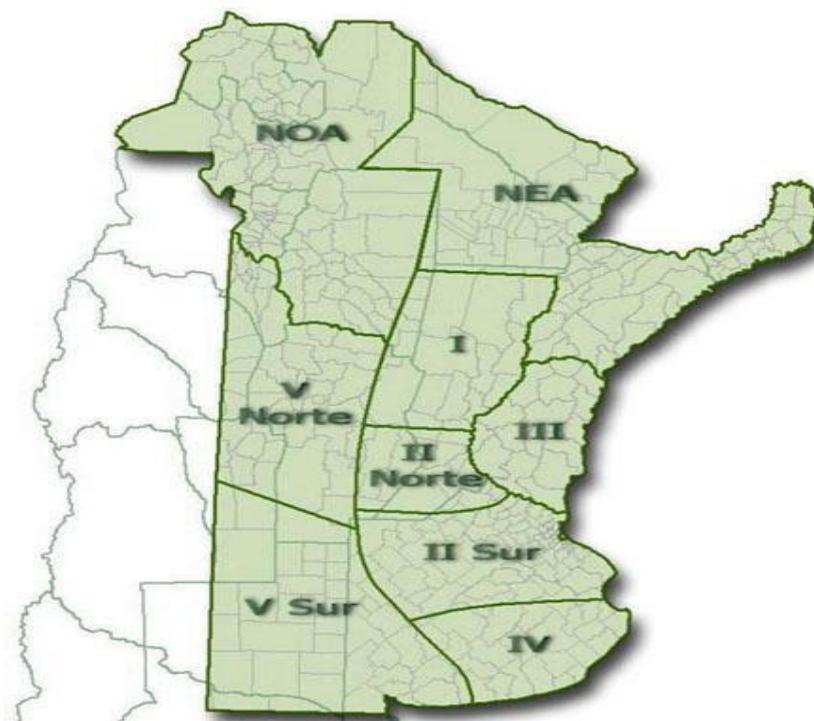


Figura 2. Subregiones ecológicas de la región triguera Argentina.

(Fuente: Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, SINAVIMO).

Las provincias que más aportan a la producción del trigo en la Argentina son Buenos Aires (3.24 Mt), Córdoba (1.14 Mt), Santa Fe (0.9 Mt), Entre Ríos (0.3 Mt) y La Pampa (0.3 Mt) (SIIA, 2014). Cerca del 90% de la producción nacional surge de la región pampeana y los rendimientos del cultivo varían ampliamente entre regiones productivas.

3.2. Soja: Importancia del cultivo

La soja es utilizada desde hace cientos de años por los chinos para consumo humano como complemento del arroz u otro cereal, para consumo animal y en el tratamiento de algunas enfermedades (Sinclair y Backman, 1989; FAO, 2015). El grano contiene entre 20 y 25% de hidratos de carbono, 13 a 24% de aceite y entre 35 y 50% de proteínas (Satorre *et al.*, 2010). El procesamiento de soja conduce a la obtención de dos subproductos principales: aceite y harina. Esta última, rica en proteínas, es de aplicación directa al consumo humano como integrante de otros productos alimenticios o como materia prima en la formulación de alimentos balanceados para la producción de carnes rojas y

blancas, la cual sigue siendo la aplicación dominante. Por su parte, puede mencionarse que el aceite comestible de soja es utilizado para la elaboración de margarinas, mantecas, aceite para ensaladas y aceites de cocina, y los excedentes de su extracción son utilizados como insumos de alimentos para animales.

Debido al crecimiento de las demandas alimentarias mundiales se impulsó un crecimiento sin precedentes en la agricultura de granos con el cultivo de soja como gran movilizador de la frontera agrícola. En la actualidad, la producción mundial de este grano sigue una tendencia de aumento, alcanzando valores de 240.42, 268.82, 282.86 Mt y llegando a 318.79 Mt entre las campañas 2011/12 y 2014/2015, con expectativas de continuar aumentando (USDA, 2016). Los principales países productores son Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay y Canadá (Figura 3), siendo a su vez los tres primeros países los principales exportadores de granos de soja seguidos por Paraguay y Canadá. La participación de Argentina en las exportaciones mundiales sigue una tendencia de aumento leve con valores de 7.36, 7.73, 7.84 Mt y alcanzando 10.57 Mt para las campañas entre 2011 y 2015. Esto podría responder, por un lado, a la fuerte demanda de China en las importaciones y en la última campaña, a la baja de las retenciones a las exportaciones realizada recientemente en el país (USDA, 2016).

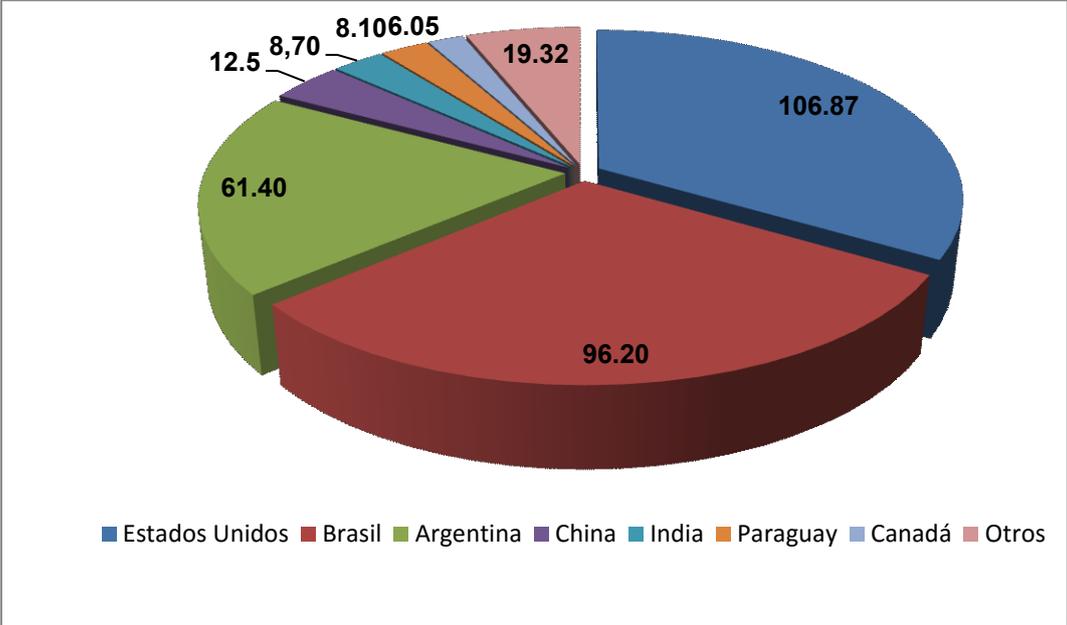


Figura 3. Producción mundial de mundial de soja (Mt).

(Fuente: elaboración propia en base a datos del USDA, 2016).

La producción de aceite de soja en el mundo, a su vez, se ha ido incrementando en los últimos años con valores de 43.41, 45.02 y 48.99 Mt entre las campañas 2012/13 y 2014/15, ocupando el segundo lugar de los aceites producidos. Los principales países

productores de este aceite son China, Estados Unidos, Argentina y Brasil con valores de 13.35, 9.71, 7.69 y 7.66 Mt (aceite crudo), siendo India y China los principales países importadores (datos para la campaña 2014/15, USDA, 2016). A su vez, la producción mundial de harina de soja sigue una tendencia de aumento con valores de 207.17 Mt para la campaña 2014/15, ocupando la Argentina el tercer lugar luego de China y Estados Unidos, con una producción de 30.93 Mt y el primer lugar en exportación, con valores de 28.54 Mt (USDA, 2016).

La participación de nuestro país en el mercado mundial se debe principalmente a la incorporación y adopción de innovaciones tecnológicas a lo largo de los años que han permitido la obtención de mejores rendimientos y menores costos. Entre ellos pueden mencionarse, en la década del '70 la difusión de la práctica del doble cultivo trigo-soja (soja de segunda), en los '80 la incorporación del uso de inoculantes, herbicidas y variedades de ciclo corto y en los '90 los cultivos transgénicos como las resistentes al glifosato RR (Roundap Ressistant) (Rossi, 2012). Ello ha conducido a un gran incremento en la superficie sembrada en el país incorporando nuevas tierras, aún desplazando cultivos tradicionales como el girasol, maíz, sorgo o tierras destinadas a ganadería o a la producción láctea o avanzando sobre áreas forestadas, dados los menores costos de producción y mayores márgenes de ganancia. De esta manera, entre las campañas agrícolas 1970/71 y 2006/07, el área sembrada con soja creció a una tasa promedio del 18.3% anual, mientras que la producción al 20.4% y los rendimientos a 1.7% anual. Así, la superficie sembrada aumentó de 37.700 ha en la campaña 1970/71 a 14.4 Mha en 2004/05 y 16.14 Mha en 2006/07. Sin embargo, a partir del año 2008 los incrementos fueron de solo 0.6% Mha llegando a 20.2 Mha para la campaña 2014/15, lo cual podría ser el resultado de una estabilización o incremento más modesto sumado a condiciones climáticas adversas, en particular las precipitaciones, así como a las retenciones a las exportaciones de esta oleaginosa (Muñoz, 2012; SAGPyA, 2008; BCR, 2016).

Por su parte, la producción nacional de soja aumentó de 21.86 t a 1.75 Mt en los quinquenios 65/69 y 75/79, respectivamente, continuando con valores crecientes de 35.51Mt para la campaña 2008/09, alcanzando las 57.94 Mt en el período 2009/10, si bien con descensos en las campañas 2011/12 y 2012/13 con valores de 44.75 y 40.30 Mt presumiblemente por las condiciones climáticas adversas dadas en ese período (Distéfano de Vallone y Giorda, 1997; Muñoz, 2012; USDA, 2016). Los rendimientos también acompañaron este crecimiento, aumentando paulatinamente a pesar de la incorporación de áreas marginales para el cultivo posiblemente como resultado de las innovaciones genéticas entre otras causas, desde 1500 a aproximadamente 2774 kg/ha entre los años 1972/73 a la actualidad (BCR, 2016).

El incremento en la expansión de la soja en la Argentina a su vez, coincidió con la expansión de la industria procesadora, un complejo industrial sojero que representa alrededor del 27% del total de las exportaciones de nuestro país, que está constituido por un conjunto de industrias que se desarrollaron notablemente a partir de los años ochenta, con inversiones que superan 5.000 millones de dólares desde mediados del '90 (Rossi, 2012). Argentina ocupa actualmente el tercer lugar en el mundo como productor y exportador de granos y primero como exportador de aceite y harina (USDA, 2015). La Unión Europea es el principal destino de nuestras exportaciones a causa de la enfermedad conocida como “vaca loca” en animales que terminó con la alimentación del ganado con productos de origen animal. Se ha observado una gran demanda en estos subproductos, principalmente por parte de China e India, para ser utilizados en alimentación animal (Lanteri, 2008). Asimismo, durante los últimos años el encarecimiento del precio del petróleo, del costo de la energía y además las obligaciones de los países para el cuidado del medioambiente, hicieron que se valorizara el aceite de soja, ya que es uno de los cultivos utilizados para la elaboración de biodiesel, un producto alternativo a los derivados del petróleo, gas y combustibles fósiles que presenta beneficios medioambientales (CARBIO, 2015). Diferentes países establecieron porcentajes obligatorios para la mezcla de sus combustibles, especialmente para transporte, con biodiesel o bioetanol, lo que conllevó a un aumento en la demanda a países como Argentina por ser uno de los principales países productores y el primer exportador de biodiesel con valores de 1.6 Mt para el 2014 (INTA, 2011; CARBIO, 2015).

3.2.1. Subregiones ecológicas de la región sojera Argentina

El cultivo de soja en Argentina está ampliamente difundido en diferentes regiones con características ecológicas diferentes, extendiéndose desde los 23° hasta aproximadamente los 39° de latitud Sur. La soja se ha expandido desde la zona central (región pampeana) hacia provincias y departamentos del sur que anteriormente eran consideradas marginales para este cultivo por frío y latitud, si bien la principal limitante frecuentemente es el estrés hídrico (Salado Navarro, 2012). La incorporación de nuevos paquetes tecnológicos hizo posible alcanzar buenas producciones en áreas consideradas no tradicionales, en algunos casos avanzando sobre montes nativos como el bosque chaqueño. Así, la soja se siembra actualmente en las provincias del NOA (Santiago del Estero, noroeste y sur de Salta y Tucumán), del NEA (Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones representando un 14% de la superficie del país), Mesopotamia, llanura pampeana y su zona oeste, hasta Río Negro (Figura 4). La producción nacional se localiza en 15 provincias

productoras, si bien la mayor concentración es en la región pampeana con el 94% de la superficie sembrada y el 95% de la producción total del país. El mayor aporte a la producción nacional proviene de las provincias de Buenos Aires (19.6 Mt), Córdoba (18.6 Mt) y Santa Fe (11.8 Mt), en las que se obtienen los mejores rendimientos. Entre Ríos aporta con 1.5 Mt, La Pampa con un 1.3 Mt y desde 2004/05 se incorpora la soja del norte con 1.9 Mt producidas en Santiago del Estero, 1.12 Mt en Chaco, 1.14 Mt en Salta y 0.41 Mt en Tucumán) y luego la provincia de Entre Ríos (SIIA, 2016).

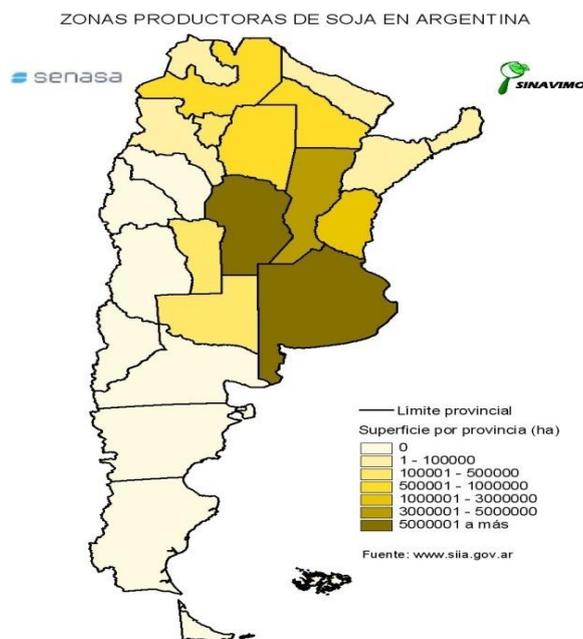


Figura 4. Subregiones de cultivo de soja.

(Fuente: Sistema Integrado de Información Agropecuaria, SIIA, Servicios Agrícolas Provinciales; Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Ministerio de Agroindustria de la Nación).

4. ENFERMEDADES DEL TRIGO Y DE LA SOJA

Dada la importancia de estos cultivos a nivel nacional y mundial, la seguridad alimentaria ha ganado prioridad en la agenda internacional, discutiéndose distintas estrategias para aumentar los rendimientos. Cabe mencionar aquí que el potencial de la producción agrícola es el resultado de la interacción de una serie de factores bióticos y abióticos que pueden limitar su rendimiento, regular su calidad y comportamiento de modo variable entre las distintas regiones ecológicas productoras. Entre las más importantes limitantes del rendimiento y la calidad de los cultivos se incluyen a las enfermedades de las plantas (Agrios, 2005).

A su vez, es importante mencionar que ante el aumento de la población, se han desarrollado nuevos métodos agrícolas para satisfacer las necesidades alimenticias, sin embargo éstas tecnologías han influido en el nivel de desarrollo y velocidad de difusión de las enfermedades que afectan a los cultivos (Agrios, 2005). Como ejemplo, la siembra directa que, si bien contribuye a la reducción de la degradación del suelo, a los costos de producción y a la conservación de la humedad del suelo, genera nuevas condiciones sanitarias por la permanencia de los rastrojos en superficie que modifican la epidemiología y prevalencia de diversas enfermedades (Satorre *et al.*, 2010).

Se ha estimado que las enfermedades que afectan al trigo, en América del Sur, causan pérdidas promedio que oscilan entre un 20 y un 30%, valores que dependen del genotipo, características del patógeno y de las condiciones ambientales (Carmona, 2005).

En cuanto al panorama sanitario de la soja en la Argentina ha cambiado en los últimos años pasando de ser un cultivo prácticamente libre de enfermedades a la situación actual, donde se considera a las mismas como responsables de severas reducciones en el rendimiento y la calidad, con el consecuente impacto negativo en la producción y rentabilidad del cultivo (Couretot e Ivancovich, 2009). Ello se debe a los cambios en la tecnificación como la implementación del monocultivo asociado a la siembra directa, la reducción del espacio entre líneas, la difusión de cultivares susceptibles, el riego y los cambios climáticos (Gally, 2003). A nivel mundial, las pérdidas de rendimiento ocasionadas por las enfermedades en soja oscilan entre el 10 y el 15% y en Argentina, numerosos autores reportan pérdidas de rendimientos muy variables según regiones y condiciones climáticas imperantes durante cada campaña. Así pueden mencionarse valores de reducción de un 8 al 10% del total de la producción a causa de las principales enfermedades (Formento, 2005; Couretot e Ivancovich, 2009; Ivancovich, 2011) hasta valores de un 30% (Vallone *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2005).

4.1. Principales enfermedades del trigo

Durante su ciclo fenológico, el trigo se ve afectado por una serie considerablemente amplia de enfermedades, la mayoría de ellas de origen micótico que afectan la raíz, tallos, hojas, espigas y granos. Por la frecuencia de aparición y niveles de desarrollo epidémico que alcanzan se considera que las de mayor importancia relativa son las que afectan los tejidos foliares y a la espiga y granos. Entre las principales enfermedades foliares que afectan al trigo se encuentran la roya anaranjada (*Puccinia triticina*) Eriks, la septoriosis [*Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous] y la mancha amarilla (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler), objeto de estudio en esta tesis (Carretero, 2010). Estas

enfermedades producen disminución del índice de área foliar y alteraciones en la redistribución de fotosintatos, lo cual ocasiona pérdidas de rendimientos que varían según la tolerancia de los cultivares, el estado fenológico en el que ocurren, la severidad de la enfermedad, el sistema de producción y las condiciones ambientales.

4.1.1. Mancha amarilla de la hoja

La mancha amarilla (MA) es considerada de gran importancia por su crecimiento alarmante y su potencial destructivo, en especial en campos bajo siembra directa, siendo la enfermedad del trigo que más se relaciona con las prácticas de laboreo que dejan residuo en superficie (Melo Reis y Carmona, 1995; Annone y Kohli, 1996). En los últimos tiempos, sin duda debe considerarse como la enfermedad foliar más difundida y que ha mostrado el mayor incremento en incidencia y severidad, pasando a ser un problema importante no solo en el país sino también en el mundo. Asimismo, los cambios climáticos, el uso de semillas infectadas, genotipos susceptibles y el monocultivo, han contribuido a la difusión de la enfermedad (Luck *et al.*, 2011).

La mancha amarilla del trigo se encuentra en las principales zonas templadas de cultivo del trigo, siendo una de las de mayor importancia para la región productora Norte debido a que se dan las condiciones óptimas para su desarrollo (Annone, 2006). Las pérdidas de rendimiento en trigo a causa de esta enfermedad son variadas registrándose a nivel mundial valores del 12.9% (Hosford y Busch, 1974), del 40% (Mehta y Gaudencio, 1991) y del 50% (Rees *et al.*, 1986). En Argentina, los efectos de esta enfermedad sobre los rendimientos también han mostrado valores variables alcanzando niveles importantes (Moreno, 2014). Pueden mencionarse las pérdidas registradas en 1994, del 20% (Annone *et al.*, 1994) y en 2001, del 8 al 32% (Annone *et al.*, 2001). En el año 2007, Formento *et al.* (2007) reportaron pérdidas de 14% en rendimiento de grano, de 8 a 11% de reducción en peso de mil granos y entre 1.2 y 4.5% en el peso hectolítrico y Simón *et al.* (2011) de 7 a 11.4% según los años.

La enfermedad es también conocida como mancha parda, tostada o bronceada o Helminthosporiosis, dado que el agente causal estuvo originalmente incluido taxonómicamente dentro del género *Helminthosporium*. Afecta varias especies de gramíneas, tales como agropiro, cebadilla, pasto ovilla, centeno, avena, falaris y malezas pertenecientes a los géneros *Cynodon*, *Panicum*, *Stipa*, *Andropogon*, *Agrostis*, etc. El triticale, la cebada y el centeno son afectados con menor frecuencia.

La mancha amarilla fue observada por primera vez a fines de la década del '20 en Japón (Hosford, 1981), produciendo en 1954 una epifitía en Kenia que ocasionó pérdidas del

75% (Gilchrist *et al.*, 1984). En Estados Unidos fue detectada en 1940 (Barrus, 1942) y reportada como frecuente desde 1970 (Sim y Willis, 1982), en 1974, en Canadá (Tekauz, 1976) en 1979, en Australia y en países como Asia, Pakistán, República Checa, Polonia, Ucrania, Hungría, Francia, Dinamarca y otros países de Europa (Sarova *et al.*, 2002). En América del sur en 1983 fue detectada en Colombia, Ecuador y Perú (Dubin, 1983). También ha sido señalada en Bolivia, Paraguay y Uruguay. En Argentina fue observada por primera vez en la década del '80 en el norte de la provincia de Buenos Aires y en 1994 en las localidades de Marcos Juárez, Monte Buey, Bigand, Hughes y Bragado en lotes de siembra directa (Annone, 1985; Melo Reis y Carmona, 1995). Según algunos autores esta enfermedad una vez introducida en un área en la que existen otros patógenos como *Septoria nodorum* y *S. tritici*, se convierte en el patógeno dominante a lo largo de los años (Wright y Sutton, 1990).

Etiología

Pyrenophora tritici-repentis (Died.) Drechsler, agente causal de la mancha amarilla de la hoja de trigo es un hongo de hábito facultativo (saprótrofo) perteneciente al reino Fungi, Phylum *Ascomycota*, Clase Loculoascomycetes, Orden Pleosporales cuyo anamorfo se corresponde con *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker (*Ptr*), Phylum *Ascomycota*, Clase Deuteromycetes (Agris, 2005).

La forma telemórfica del hongo presenta ascocarpos (protopseudotecios) de color marrón oscuro a negros, esféricos a subsféricos, lisos, de 400 a 500 μm de diámetro con una prolongación a modo de pico de 160 μm de longitud y 120 μm de ancho, con setas largas de 80 a 120 μm de longitud y 9 μm de ancho basal que gradualmente se va afinando hacia el ápice (Figura 5).

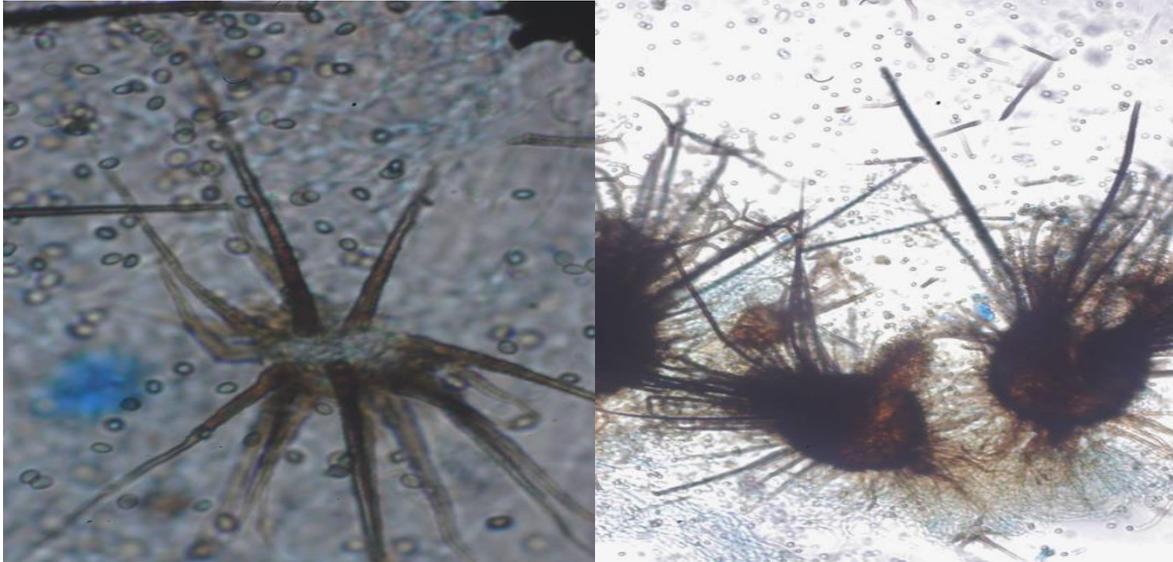


Figura 5. Ascocarpos de *Pyrenophora tritici-repentis*.

(Imagen Larran, S.).

Las ascas, bitunicadas, cilíndricas, estrechas hacia la base, de 185-215 x 45-55 μm , llevan en su interior 8 ascosporas. Estas son biseriadas en el centro y uniseriadas hacia el ápice, de color pardo amarillento brillante, inmaduras son largas, angostas y escasamente aguzadas, y a medida que maduran se hinchan las células hemisféricas y tienen una funda hialina de 2-5 μm de ancho, germinado por cualquiera de sus células. Las ascosporas miden 47-65 x 20-26 μm , con una longitud media de 12-17 μm (Ellis y Waller, 1976). En la fase asexual, la estructura reproductiva presenta conidióforos simples o en grupos de 2 a 3, rectos o flexuosos, pardo amarillentos, de pared lisa, rectos o moderadamente flexuosos, a veces geniculados, cilíndricos, ligeramente aguzados hacia el ápice y dilatados en la base. Miden aproximadamente 250 μm de largo y ocasionalmente 400 μm y entre 6-12 μm de ancho. Los conidios son solitarios, rectos o ligeramente curvados, cilíndricos y con un ápice redondeado y cónico, característica que les brinda el nombre de “cabeza de cobra”. Son subhialinos, de color pardo rojizos claros, lisos, de paredes finas, con 1 a 9 pseudoseptos (normalmente 5 a 7), conidios maduros frecuentemente constrictos en los pseudoseptos, de 80 a 250 μm (media 117) de longitud, de 14 a 20 μm (media 17.7) de ancho en la sección más ancha y de 2 a 4 μm (media 3) en la base (Ellis y Waller, 1976) (Figura 6).

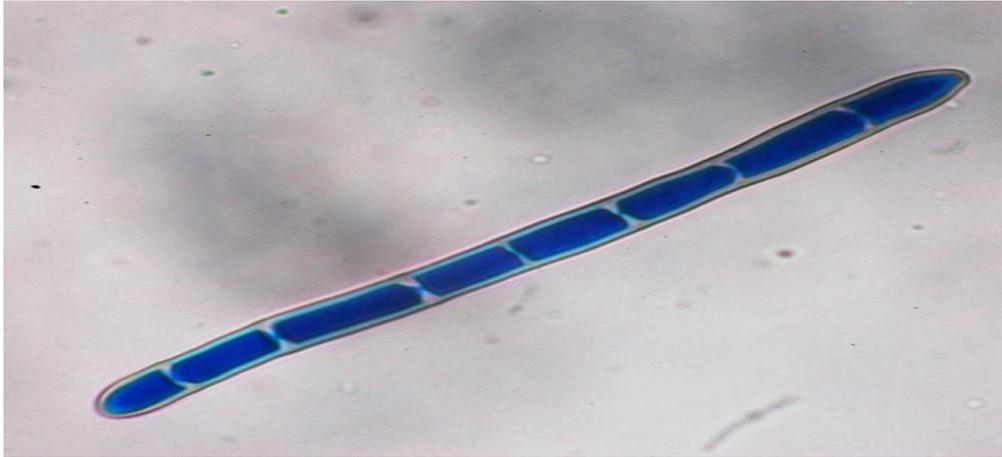


Figura 6. Conidio del estado asexual de *Pyrenophora tritici-repentis*.

(Imagen Larran, S.)

Síntomas y signo

Los síntomas más comunes de la mancha amarilla se observan en hojas y vainas, apareciendo después de la emergencia del trigo, cuando se produce la expansión de la plúmula. Luego de la penetración del hongo en los tejidos foliares aparecen pequeñas manchas cloróticas, 24 a 48 h después de la infección. Posteriormente, el área de tejido clorótico aumenta de diámetro, observándose una región central necrosada de color parda. Tanto el borde clorótico como las zonas necrosadas aumentan en superficie, en función del tiempo. Estas lesiones son elípticas y de tamaño variable pudiendo alcanzar los 12 mm de tamaño. El nombre común de la enfermedad “Mancha Amarilla” de la hoja del trigo se debe a la presencia del halo de tejido amarillento que circunda las lesiones. (Figura 7). Este halo es atribuido a la producción de toxinas por el agente causal (Melo Reis y Carmona, 1995). Sin embargo, este hongo también puede afectar a las semillas produciendo oscurecimiento o granos rosados (Rees y Platz, 1979).

El signo de la enfermedad lo constituyen los conidios y conidióforos del hongo que se presentan sobre las manchas, principalmente en hojas basales ya que la esporulación se ve favorecida por la humedad.



Figura 7. Síntomas de la mancha amarilla en hojas de trigo.

(Imagen Larran, S.)

Ciclo de la enfermedad

La principal fuente de inóculo de *P. tritici-repentis* son las semillas infectadas que permiten la vehiculización a largas y cortas distancias, introduciendo al patógeno en países, estados o campos en los cuales no existía. El patógeno se aloja en el pericarpio de la semilla como micelio e infecta a las hojas jóvenes. Otras fuentes de inóculo son los restos culturales del trigo (rastrojo), existiendo una relación directa entre la cantidad de rastrojo en superficie y la severidad de la enfermedad en el cultivo siguiente, y otros hospedantes como *Agrostis* sp., *Agropyron* spp., *Avena sativa*, *Dactylis glomerata*, *Phalaris arundinacea*, *Stipa viridula*, *Secale cereale*, entre otros (Melo Reis y Carmona, 1995; Moreno, 2014).

Desde la semilla, el hongo se transmite vía coleoptilo, presentando lesiones alargadas, pardas, de hasta 2 mm de diámetro en coleoptiles y plúmulas y desde el rastrojo a las primeras hojas, provoca necrosis y esporula. Luego el viento transporta los conidios a nuevos sitios de infección en otras hojas o plantas. Para este transporte se requiere que la superficie de la hoja esté seca.

En situaciones de siembra directa y monocultivo, el inóculo principal son las ascosporas generadas en los protopseudotecios en trozos de tallos y vainas de trigo infectados. Los conidios, si bien en menor cantidad se producen en los restos vegetales, pueden formarse a partir de lesiones en trigo guacho, otras gramíneas o malezas (hospedantes secundarios). Las ascosporas son eyectadas en presencia de humedad al aire, alcanzado alturas de 10 cm y por el viento al igual que los conidios hacia las hojas del trigo. Las ascosporas o conidios una vez depositados en la superficie de los órganos verdes

(hojas y vainas) germinan en presencia de agua libre iniciando la infección primaria. Una vez producida la necrosis en las células de la parte central de la mancha, el patógeno comienza a esporular generando conidios para la infección secundaria. La cantidad de inóculo producido aumenta en función del incremento del área afectada. Los conidios alcanzan nuevas hojas y nuevas plantas, llegando a las hojas superiores y semillas a lo largo del ciclo del cultivo. La esporulación continúa en los restos culturales después de la cosecha del trigo hasta que comienzan a formarse los protopseudotecios. El patógeno puede producir inóculo e infectar al cultivo en un rango amplio de temperaturas (entre 10 y 30°C) y períodos de 6 a 48 horas de humedad relativa (Melo Reis y Carmona, 1995; Moreno, 2014).

4.2. Principales enfermedades de la soja

Se han descrito más de 40 enfermedades que afectan a la soja. El impacto de estas enfermedades es variable siendo algunas de ellas endémicas, pudiendo o no causar pérdidas de rendimiento considerables mientras que otras ocasionan importantes pérdidas bajo condiciones favorables para su desarrollo (Ploper, 2015). Entre las principales enfermedades, diversos autores destacan por su prevalencia y severidad a las de fin de ciclo (tizón de la hoja y mancha púrpura de la semillas, antracnosis, mancha marrón, tizón de la vaina y del tallo, entre otras) y a la mancha en ojo de rana, que afectan hojas, tallos, vainas y semillas (Formento *et al.*, 2009; Carmona, 2014). Sin embargo, deben destacarse las enfermedades de raíz y tallo, que conforman un grupo potencialmente peligroso, según las regiones, condiciones ambientales o situaciones productivas tales como la falta de rotaciones adecuadas (Sillón, 2012). Entre éstas, a continuación se aborda a la podredumbre carbonosa de la soja, la cual es objeto de estudio en el presente trabajo.

4.2.1. Podredumbre carbonosa

La podredumbre carbonosa es una enfermedad económicamente importante para diferentes cultivos de América del Norte y Sur, Asia, Australia, África y algunas partes de Europa. En Estados Unidos su importancia ha ido en aumento, produciéndose pérdidas de 2.3% y valores máximos de 12.3% en el año 2000, siendo según estimaciones de pérdidas la enfermedad más importante que afecta a la soja en este país (Mengistu *et al.*, 2015). En Argentina, esta enfermedad ha sido siempre considerada como una adversidad de menor importancia, sin embargo, al extenderse el área cultivada con soja a diversas regiones no tradicionales y dadas las características climáticas de estas regiones y condiciones de suelos pobres, en la actualidad enfermedades como la podredumbre carbonosa están

surgiendo con gran incidencia debido a que afectan a un porcentaje elevado de plantas. Asimismo, esta enfermedad viene cobrando importancia año a año a causa del cambio climático, y al estar siempre presente en nuestros suelos, es considerada “oportunistista”.

En nuestro país, en la campaña 2000/2001 fue registrada en zonas productoras del NOA, NEA y regiones norte y centro-sur de Córdoba según las condiciones ambientales (Cabrera *et al.*, 2001). Su presencia fue detectada causando daños de diversa magnitud con pérdidas totales del cultivo en algunos casos (entre 30 y 100%) infectando a todas las variedades cultivadas en la región, con alta incidencia y severidad debido a las condiciones de tiempo cálido y seco que prevalecieron durante un período prolongado (Cabrera *et al.*, 2001; Ploper *et al.*, 2001). Durante la campaña 2008/09, se presentó en las zona centro y norte de Santa Fe, Chaco, Buenos Aires y en menor medida, en Salta con niveles máximos de incidencia de un 40% (Distéfano y Gadbán, 2010). En la zona sur de Santa Fe en las últimas campañas dadas las condiciones de estrés imperantes en la zona, ha sido registrada como una de las enfermedades más frecuentes que afectaron raíz y tallo (Lago, 2009). Mientras que en Entre Ríos en la campaña 2012/2013 la enfermedad estuvo asociada al estrés hídrico (com. Pers. Ing. Norma Formento, INTA Paraná, ER). En Tucumán se registró que los valores de incidencia de la enfermedad fueron aumentando con los años, alcanzando valores entre 1 y 5% en la campaña 2010/2011, entre 5 y 30% en 2011/2012 llegando a valores entre 5 y 90%, y en algunos lotes al 100% en la campaña 2012/2013 (Reznikov *et al.*, 2013).

Etiología:

El agente causal es el hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich (MP) clasificado dentro del Phylum Ascomycota, clase Deuteromycetes (Agrios, 2005). Es un hongo polífago que afecta cerca de 500 especies incluyendo plantas cultivadas y malezas comprendidas en más de 100 familias alrededor del mundo, como maní, girasol, sorgo, maíz, entre otros (Srivastava *et al.*, 2001). Presenta dos fases asexuales dentro de su ciclo de vida, una fase esclerocial (*Rhizoctonia bataticola* (Taubenhaus) Butler) que es saprofítica y una fase picnidial patogénica (*M. phaseolina*) y una fase sexual (*Orbilia obscura* (Ghosh) Mukerji y Basak) (Aguayasol *et al.*, 2014). El hongo presenta una amplia variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética por lo cual ha podido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y tener una amplia distribución geográfica. Es altamente variable presentando aislamientos que difieren en el tamaño de los esclerocios y la ausencia o presencia de picnidios siendo en soja su estado picnidial muy poco común (Mengisu *et al.*, 2015).

Las colonias en cultivo presentan micelio superficial o inmerso, ramificado y septado, blanco a castañas o grisáceas, haciéndose más oscuras al envejecer. Como estructura

reproductiva presenta picnidios globosos, marrón oscuro a negros, membranosos a subcarbonosos, con ostíolo central circular de 100 a 200 μm de diámetro, inicialmente inmersos en el tejido del hospedante y luego al madurar se hacen errumpentes. Los conidióforos son simples, en forma de barra, miden entre 10-15 μm de largo, las células conidiógenas son fialídicas, hialinas y lisas y cuyas medidas son entre 5-13 x 4-6 μm . Los conidios (picnidiosporas), son unicelulares, de forma oval-alargada o elíptica, a veces curvos o contorneados en forma irregular, hialinos y de tamaño variable, con una relación largo-ancho de 3:1 (14-33 x 6-12 μm). El hongo produce microesclerocios negros, lisos, de forma redonda, oblonga o irregular, variando su tamaño y forma según el aislamiento y el sustrato utilizado, siendo en APG de un diámetro que va de 75 a 150 μm (Sutton, 1980) (Figura 8) (Sutton, 1980).

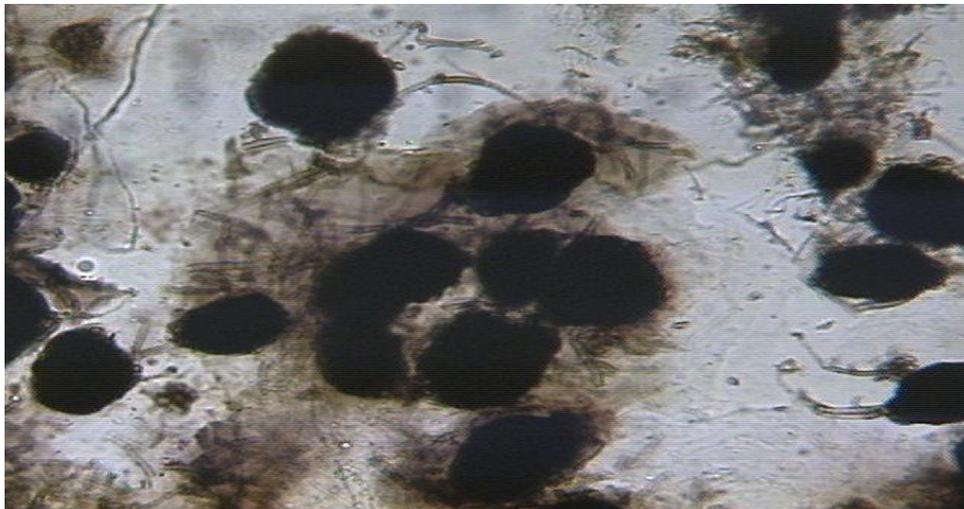


Figura 8. Microesclerocios de *Macrophomina phaseolina* en APG al 2%.

(Imagen Larran, S.)

Síntomas y signo

La podredumbre carbonosa es una enfermedad asociada principalmente a plantas adultas, sin embargo la soja es susceptible a la podredumbre radicular durante todas las etapas de su desarrollo. Su presencia predomina en dos momentos, en la emergencia hasta V2 y en planta adulta, principalmente después de floración (Distéfano de Vallone y Giorda, 1997). Las semillas infectadas pueden ser asintomáticas o sintomáticas, desarrollando frecuentemente microesclerocios en las rajaduras de las cubiertas. Así, el hongo permanece latente hasta que germina la semilla. Las semillas pueden no germinar, germinar y ser sintomáticas o asintomáticas. Las semillas germinadas pueden originar plántulas débiles que mueren a los pocos días. En esta primera etapa puede producirse la podredumbre de la semilla mostrando lesiones hundidas castaño rojizo en el epi e hipocótilo que se tornan de

coloración gris ceniza a negro pudiendo extenderse hacia los cotiledones y cubrirlos por completo y, a menudo envuelven los pecíolos de las hojas, causando el estrangulamiento del tallo y ocasionando la muerte de la plántula (Figura 9). A su vez, la infección puede originarse desde las raíces observándose una decoloración a nivel de la línea del suelo y hacia arriba que se torna marrón oscura a negra ocasionando necrosis. Al remover los tejidos corticales se observan microesclerocios negros que dan una apariencia carbonosa, lo que le da el nombre de podredumbre carbonosa a esta patología.



Figura 9. Síntomas de la podredumbre carbonosa en semillas de soja.

(Imagen cortesía de la Ing. Agr. M.M. Scandiani).

Si las condiciones ambientales son cálidas y secas, las plántulas afectadas pueden morir. En cambio, si el clima es húmedo y frío, la infección se hace latente y puede reaparecer en estadios posteriores en condiciones de calor y sequía. Habitualmente los síntomas se observan en manchones asociados al microrelieve del lote. En estos sectores las plantas se marchitan abruptamente y mueren. Cuando las infecciones son posteriores al estado de plántula suelen provocar síntomas no específicos hasta mediados del ciclo del cultivo como hojas de menor tamaño, menor altura y otros relacionados a pérdida de vigor. A partir de floración, frente a condiciones favorables para el patógeno aparecen los síntomas más característicos de la enfermedad que son el amarillamiento anticipado de las hojas, las que luego se marchitan abruptamente quedando adheridas al tallo de la planta por mucho tiempo. Los tejidos de la base del tallo se decoloran a nivel de la línea del suelo y las vainas y las semillas detienen su desarrollo. En los tejidos epidérmicos y subepidérmicos de las raíces y parte inferior del tallo, de los que se extrae fácilmente la epidermis, se observa una coloración grisácea provocada por la presencia de numerosos microesclerocios oscuros. Las plantas finalmente mueren. Al cortar longitudinalmente la raíz principal y la base del tallo

se pueden observar estrías o líneas de color negro (Cabrera *et al.*, 2001; Ploper y Scandiani, 2009; Ivancovich, 2011; Mengisu *et al.*, 2015) (Figura 10).



Figura 10. Síntomas de la podredumbre carbonosa en soja.

(A) Síntomas anticipados en hojas; (B) Podredumbre radicular; (C) y (D) corte longitudinal de tallo y raíz con microesclerocios y líneas negras características de la enfermedad. (Imágenes cortesía de las Ing. Agr. N. Formento y M.M. Scandiani).

Ciclo de la enfermedad

Los microesclerocios de *M. phaseolina* sobreviven en el suelo o en los rastrojos de plantas enfermas, pudiendo perdurar más de 2 años en suelos secos, más de tres años como micelio en semillas asintomáticas y como microesclerocios en semillas infectadas, mientras que si los suelos son húmedos sólo sobreviven entre 7 y 8 semanas. A su vez, las semillas son fuente de inóculo de esta enfermedad transportándola a corta y larga distancia, ocasionando la podredumbre de la semilla o perdurando en forma latente. Los microesclerocios pueden germinar en la superficie o en la proximidad de las raíces produciendo numerosos tubos germinativos penetrando a través de la formación de

apresorios o por aberturas naturales. Las hifas crecen primero intercelularmente y luego intracelularmente a través del xilema formando nuevos microesclerocios y produciendo su taponamiento con el consecuente marchitamiento y muerte prematura de la planta (Ploper *et al.*, 2001). Luego de la cosecha, los microesclerocios quedan protegidos en los restos del cultivo hasta que éstos se descomponen y quedan en el suelo para reiniciar el ciclo de la enfermedad (Mengisu *et al.*, 2015).

Condiciones predisponentes

La infección es favorecida por condiciones que producen estrés de las plantas, tales como temperaturas superiores a 30°C (28 a 35°C) y baja humedad edáfica o sequía (al menos 7 días sin precipitaciones) especialmente durante el período reproductivo de las mismas (Ploper *et al.*, 2001). Otros factores predisponentes son los suelos compactados y la alta relación carbono/nitrógeno de los rastrojos del cultivo antecesor (Ivancovich, 2011).

5. MANEJO INTEGRADO DE LA MANCHA AMARILLA Y DE LA PODREDUMBRE CARBONOSA

5.1. Manejo integrado de la mancha amarilla

Las estrategias de manejo de las enfermedades en la actualidad se enmarcan dentro del concepto de manejo integrado de enfermedades, que utiliza los recursos y técnicas en forma racional para permitir la sustentabilidad de la producción agrícola en el tiempo. Bajo este nuevo paradigma actual, se emplean todas las tácticas disponibles teniendo siempre presente el retorno económico y la sustentabilidad ecológica, respetando como principio la racionalización del uso de agroquímicos para mantener las enfermedades a niveles inferiores a aquellos que causen daño económico al cultivo (Reis *et al.*, 2002). Así, el manejo integrado de enfermedades se basa en la resistencia genética conjuntamente con prácticas culturales (rotaciones, laboreos de suelo, ajuste de la fecha y época de siembra, elección correcta de genotipos, manejo de la fertilización, entre otras) aplicación de fungicidas, calidad de la semilla y control biológico (Reis *et al.*, 2002; Simón, 2007).

En este contexto, para el manejo de la mancha amarilla se recomienda el tratamiento de las semillas (curasemillas); tratamientos químicos de cobertura con equipos de aplicación terrestre o aérea y la rotación de cultivos. Por su parte, el mejoramiento genético para hacer frente a *P. tritici-repentis* es complicado debido a que el patógeno tiene altos niveles de variación, por un lado, con respecto a los síntomas de la enfermedad, según los genotipos y por otro, en la interacción entre los aislamientos, los genotipos del hospedante y el ambiente (Melo Reis y Carmona, 1995). Dado que la expresión de la

resistencia al patógeno es parcial o incompleta, los genotipos de mejor comportamiento frente a la infección son aquellos en que los síntomas en las hojas superiores no alcanzan a cubrir el 20 al 30% del área foliar (Rees y Platz, 1992). En la Argentina, los cultivares comerciales varían entre susceptibles y moderadamente resistentes (Simón, 2006).

Existen antecedentes en el control biológico de patógenos causantes de manchas foliares en trigo con microorganismos antagonistas (Perelló *et al.*, 2006; 2009; Stocco, 2014). Se ha señalado el empleo de bacterias antagonistas aisladas del filoplano de trigo, que redujeron significativamente la severidad de la mancha amarilla y que exhibieron una fuerte inhibición del crecimiento de *P. tritici-repentis* en ensayos llevados a cabo bajo condiciones de laboratorio e invernáculo (Alippi *et al.*, 2000).

5.2. Manejo integrado de la podredumbre carbonosa

Para el manejo integrado de la podredumbre carbonosa, debido a su infección inicial temprana y su aparición en estadíos reproductivos, se dificulta la toma de decisión de la aplicación de productos químicos, por lo cual las estrategias de manejo a utilizar deben integrar diversas tácticas. A su vez, no existen fungicidas disponibles ni tampoco niveles adecuados de resistencia genética para un control efectivo de la podredumbre carbonosa del tallo. Por lo tanto, se recomiendan una serie de prácticas culturales para minimizar los daños que esta enfermedad ocasiona (Ploper *et al.*, 2001). Entre estas, se recomienda la rotación de cultivos, en particular con gramíneas por no menos de 3 años cuando los suelos están muy infectados con este patógeno, el tratamiento de semillas y la aplicación de fungicidas en los órganos aéreos (Distéfano de Vallano y Giorda, 1997; Sillón, 2012).

Asimismo, considerando que es importante evitar situaciones de estrés del cultivo, se recomienda efectuar prácticas que permitan el escape del cultivo a las condiciones favorables para el patógeno y que conserven la humedad del suelo tales como elección de la fecha de siembra, acercamiento de surcos, adecuado control de malezas y riego; mantenimiento de un buen nivel de fertilidad del suelo, evitar la siembra de soja de segunda, después de trigo, avena o cebada, en lotes con historia de presencia del patógeno, ya que los rastrojos de esos cultivos incrementan la relación carbono/nitrógeno, que favorece a la enfermedad; evitar siembras densas y uso de semillas sanas.

Si bien, estas prácticas son aplicables para la reducción del inóculo se debe considerar que *M. phaseolina* es un patógeno “oportunista”, de difícil manejo por su extremadamente amplio rango de hospedantes, por lo que las rotaciones no resultan del

todo prácticas; por su dispersión a través de la semilla y los microesclerocios que quedan en el suelo y rastrojo.

De acuerdo a lo mencionado, a la fecha no existen antecedentes del estudio de la diversidad endofítica y de su dinámica temporal y espacial en cultivares de trigo y soja creciendo en las condiciones agroecológicas de nuestras regiones productoras de Argentina, como así tampoco de su capacidad antagonista frente a patógenos. Por lo cual, en el presente trabajo se propuso el estudio de las comunidades endofíticas presentes en ambos hospedantes, principalmente de las especies fúngicas, con miras a la búsqueda de alternativas inocuas para el manejo integrado de la enfermedades causadas por *Pyrenophora tritici-repentis* y *Macrophomina phaseolina*.

6. HIPÓTESIS

- Las plantas asintomáticas de trigo y soja hospedan comunidades endofíticas conformadas por un gran número de especies fúngicas.
- Los endófitos varían cuali-cuantitativamente según los distintos cultivares, órganos, estadios del ciclo fenológico del cultivo y las condiciones ambientales del sitio del cultivo.
- Determinados endófitos tienen potencial antagonista frente a los hongos patógenos *Pyrenophora tritici-repentis* y *Macrophomina phaseolina*.

7. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es estudiar, desde el punto de vista de la diversidad ecológica, la microbiota endofítica asociada a plantas de trigo y soja, principalmente especies fúngicas e incursionar en su significancia en la interacción con dos fitopatógenos de importancia económica, *P. tritici-repentis* y *M. phaseolina*, con miras a su biocontrol.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias de infección de microorganismos endófitos principalmente especies fúngicas, en plantas asintomáticas de trigo y soja.

- Analizar la existencia de cambios cuali-cuantitativos de las comunidades endofíticas en diferentes cultivares, en diversos órganos del trigo y de la soja (hoja, tallo, gluma, vaina y granos, según corresponda), en diferentes estadíos a lo largo del ciclo fenológico de ambos cultivos y en distintas campañas agrícolas con diferentes condiciones ambientales.
- Comparar la diversidad de las comunidades endofíticas de trigo y soja.
- Evaluar la capacidad antagónica potencial de especies endofíticas no patógenas para el control de *P. tritici-repentis* y *M. phaseolina*, causantes de la mancha amarilla del trigo y de la podredumbre carbonosa de la soja.

CAPITULO II. LA MICROBIOTA ENDOFITICA DEL TRIGO Y DE LA SOJA¹

¹ Los resultados del presente capítulo se encuentran parcialmente publicados en Larran *et al.*, 2007: The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.) World Journal Microbiology and Biotechnology 23: 565-572, citado en las referencias bibliográficas.

1. MICROBIOTA ENDOFITICA ASOCIADA AL TRIGO

1.1. Antecedentes en trigo

Numerosos autores han realizado estudios de la microflora saprófita epífita habitante de los tejidos aéreos de las plantas de trigo con miras a analizar su potencial en el control biológico de patógenos de cereales (Li y Sutton, 1995; Perelló *et al.*, 2003; 2006; Dal Bello y Mónaco, 2014). Estos estudios han demostrado que el filoplano, en particular, se constituye en un reservorio de microorganismos nativos con capacidad biocontroladora de fitopatógenos. Entre ellos, diversos hongos filamentosos, levaduras y bacterias fueron efectivos en la reducción de la severidad de las enfermedades ocasionadas por *Alternaria triticimaculans*, *Bipolaris sorokiniana*, *P. tritici-repentis* y *Zymoseptoria tritici* en trigo, así como también mostraron capacidad para alterar la morfología de las hifas y/o conidios y para reducir la germinación conidial de estos fitopatógenos (Dal Bello y Mónaco, 2014). Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo a fines de analizar la micobiota endofítica del trigo. Los estudios preliminares realizados en plantas asintomáticas demostraron la presencia de *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. y de otras especies patógenas en diversos órganos (Bannon, 1978; Luginbühl *et al.*, 1979). En 1988, Sieber *et al.* registraron como principales especies endófitas de trigo a *S. nodorum*, *A. tenuissima* (Nees & Nees: Fr.) Wiltshire, *Epicoccum purpurascens* Ehrenb.: Schlecht, *Idriella bolleyi* (Sprague) von Arx, *Fusarium graminearum* Schwabe y *F. culmorum* (Smith) Smith en diferentes tejidos, clasificándolas como conocidos patógenos del trigo; especies comunes del filoplano (saprobios o patógenos débiles) y especies ocasionales en trigo.

A partir de estos trabajos, algunos investigadores han enfocado sus estudios en la detección temprana de endófitos “patógenos latentes” utilizando diversas técnicas para el aislamiento (Gindrat y Pezet, 1994; Formento y Schutt de Varini, 2009). Otros investigadores, aislaron e identificaron hongos endófitos miembros de los géneros *Neotyphodium* y *Acremonium* a partir de diferentes especies de trigos salvajes de Turquía, algunos de los cuales fueron demostrados ser transmitidos verticalmente. Estos autores sugirieron su posible uso como agentes de control biológico de enfermedades o para mejoramiento de las respuestas de trigos cultivados frente al estrés abiótico (Marchall *et al.*, 1999).

Las investigaciones de Sieber *et al.* (1988) fueron las primeras en demostrar variaciones cuali-cuantitativas de la micobiota endofítica en los órganos, cultivares, sitios de muestreo y a lo largo del ciclo fenológico del cultivo de trigo. Estos autores a su vez, registraron los mayores porcentajes de infección endofítica en los tallos en comparación con

las hojas, lo cual atribuyeron a los altos valores de aislamiento de *S. nodorum* a partir de ese órgano.

Crous *et al.* (1995) estudiando la población endofítica del trigo en Sudáfrica demostraron que algunas especies endófitas se presentaron más frecuentemente en un determinado tejido o estuvieron restringidas al mismo como también un aumento de la colonización endofítica con la edad del cultivo. Asimismo, demostraron que las hojas presentaron las mayores frecuencias de infección en comparación con los demás órganos analizados (raíces y tallos) y que los cambios sucesionales en las poblaciones endofíticas de los diversos órganos analizados se correlacionaron más con cambios cuantitativos que cualitativos, esto es que una determinada especie aumentó o disminuyó pero no fue reemplazada por otra con el paso del tiempo.

En estos antecedentes, la mayoría de los endófitos registrados en trigo son especies fúngicas, si bien existe evidencia del aislamiento de bacterias endófitas como *Azospirillum brasilense*, especies del género *Streptomyces* y de actinobacterias como *Microbispora*, *Micromonospora* y *Nocardiodetes* a partir de raíces (Hallman *et al.*, 1997; Coombs y Franco, 2003). Especies de *Bacillus* y *Serratia* han sido encontradas frecuentemente en tallos y en granos de trigo (Larran *et al.*, 2002a; 2007).

De acuerdo a lo mencionado y a que no se han realizado a la fecha estudios de los endófitos asociados al trigo en cultivares creciendo en nuestras regiones productoras se propusieron los siguientes objetivos:

1.2. Objetivos

Con estos antecedentes, se desarrollaron ensayos para el cumplimiento de los siguientes objetivos:

- Determinar las frecuencias de infección de microorganismos endófitos, principalmente especies fúngicas, en plantas asintomáticas de trigo.
- Analizar la existencia de cambios cuali-cuantitativos de la población endofítica en diferentes cultivares, en diversos órganos de la planta de trigo (hoja, tallo, gluma y grano), en diferentes estadíos a lo largo del ciclo fenológico del cultivo y en distintas campañas agrícolas con diferentes condiciones ambientales.

1.3. Materiales y métodos

Preliminarmente se realizó un ensayo que consistió en el análisis de los endófitos fúngicos presentes en las hojas y sus variaciones cuali-cuantitativas en 3 estadíos

fenológicos del cultivo y en dos campañas agrícolas. Luego, se diseñó otro ensayo a fines de ampliar el conocimiento de los endófitos de trigo, en el que se evaluó la dinámica espacial de la microbiota endofítica a través de la evaluación de las comunidades endofíticas de distintos órganos y cultivares y la dinámica temporal, analizando posibles cambios cuali-cuantitativos de la población endofítica en 5 estadios del ciclo fenológico del cultivo.

1.3.1. Microbiota endofítica de hojas de trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes estadios y condiciones ambientales

Recolección de muestras y aislamiento de endófitos

Para la realización del ensayo se sembraron semillas de trigo del cultivar Klein Dragón en el campo Experimental J. Hirschhorn (EEJH) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), de la localidad de Los Hornos, Provincia de Buenos Aires, Argentina (coordenadas: 34° 59' IS - 57° 59' IO, altura sobre el nivel del mar: 45 m). Las parcelas experimentales se diseñaron de 3 m x 1 m y fueron rodeadas por una bordura de avena para disminuir la transferencia de inóculo. La siembra se realizó a chorrillo a 15-17 cm durante el mes de julio. El muestreo se realizó al azar a partir de plantas asintomáticas extrayendo una hoja de la zona media de cada una de 10 plantas en los siguientes estadios de crecimiento (EC): EC 32 (alargamiento, dos nudos visibles), EC 75 (grano en estado lechoso) y EC 85 (grano pastoso), según Zadoks *et al.* (1974). Las muestras fueron acondicionadas y trasladadas al laboratorio del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, a los fines de su procesamiento.

Las hojas se lavaron con agua corriente y se cortaron en 5 piezas de aproximadamente 5 mm de diámetro. Los segmentos (submuestras) fueron desinfectados superficialmente por inmersión consecutiva en etanol al 96% durante 1 minuto, hipoclorito de sodio al 2% (lavandina comercial, 55 g Cl/l) durante 3 minutos, luego fueron nuevamente sumergidos en etanol al 96% durante 30 segundos y finalmente lavados dos veces con agua destilada estéril (técnica de Luginbühl *et al.*, 1979). Cinco segmentos desinfectados de cada hoja se colocaron en placas de Petri conteniendo como medio de cultivo agar de papa glucosado (APG) al 2% elaborado con glucosa (20 g/l), agar-agar (20 g/l) y papas peladas y cortadas (200 g/l). A continuación las placas fueron incubadas en estufa en condiciones de oscuridad a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 9 días, realizándose observaciones del crecimiento de los microorganismos cada 2 o 3 días.

El ensayo fue realizado en dos campañas agrícolas consecutivas sembrando el mismo cultivar de trigo en el mismo sitio y utilizando la misma metodología, registrándose los datos climáticos de los Boletines Meteorológicos de la EEJH correspondientes a humedad media mensual, temperatura media mensual y precipitaciones mensuales y totales durante el ciclo del cultivo.

Identificación de los microorganismos

La identificación de los microorganismos fúngicos aislados se realizó directamente de las placas de Petri incubadas en APG al 2% sobre la base de las características culturales de las colonias (forma, color, textura, reverso) y morfobiométricas de las estructuras reproductivas. Para los hongos que no presentaron esporulación sobre esas placas se realizaron repiques a otros medios de cultivo como agar extracto de malta (30 g de extracto de malta/l, 20 g de agar agar/l, 5 g de peptona/l y 2 g de extracto de levadura/l), agar mineral (5 g de glucosa/l, 3.5 g de nitrato de potasio/l, 1.75 g de fosfato de potasio/l, 0.75 g de sulfato de magnesio/l y 15 g de agar/l), agar extracto de vegetales (extracto vegetal 400 g/l, agar-agar 20 g/l) (Alippi y Carranza, 1975), entre otros utilizados rutinariamente en el laboratorio para la identificación de especies y/o incubación en cámara de cría a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de 12 horas de luz cercana a la ultravioleta (NUV) a fines de inducir la formación de esporas. Para la identificación de algunas especies a su vez se realizaron microcultivos en APG al 2% los que fueron incubados en estufa a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ o cámara de cría a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, realizando un seguimiento del crecimiento para observar las características de las hifas, la ontogenia condial y su morfología.

La identificación de las especies fúngicas se realizó utilizando bibliografía específica y fue confirmada por colegas especialistas que han desarrollado sus investigaciones en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP. Se utilizaron las claves taxonómicas de Ellis (1971; 1976), Leslie y Summerell (2006) para especies del género *Fusarium* en particular, Manamgoda *et al.* (2012; 2014), Sinevanesan (1987), Sutton (1980), para identificación de coelomycetes, la de Simmons (2007) y de Woudenberg *et al.* (2013) para especies de *Alternaria*, la de Samuels (2006) para especies de *Trichoderma* y las Descripciones de Hongos y Bacterias del International Mycological Institute (IMI) del Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI).

Las bacterias y levaduras endófitas aisladas fueron identificadas en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

Análisis estadístico

Los datos de las especies aisladas fueron registrados para cada uno de los estadios relevados calculándose a partir de ellos la frecuencia de presencia de los microorganismos. La frecuencia se determinó como el cociente entre el número de submuestras (segmentos foliares) en las que se aisló un determinado endófito y el número total de submuestras incubadas x 100. Las plantas fueron consideradas como unidades experimentales (10 repeticiones). Los datos fueron transformados ($\arcsen \sqrt{x}$) para normalizar la varianza residual y se realizó un análisis de la varianza (ANAVA) en que los años, estadios y endófitos se consideraron como factores. Las medias fueron comparadas mediante el test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

1.3.2. Micobiota endofítica del trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes órganos, estadios del ciclo fenológico del cultivo y en diferentes cultivares

Relevamiento, aislamiento y caracterización de los endófitos

Para la realización del ensayo se sembraron semillas de trigo de los cultivares Buck Poncho, Buck Pronto, Klein Cobre, Klein Dragón y ProINTA Federal en el campo de la EEJH de Los Hornos en parcelas experimentales de 1 m x 1 m diseñadas en bloques al azar con 3 repeticiones cada una. La siembra fue realizada a chorrillo a 20 cm entre hileras.

El muestreo se realizó al azar tomando 5 plantas asintomáticas de cada cultivar y en cada uno de los siguientes estadios de crecimiento según Zadoks *et al.* (1974): EC 20 (comienzo de macollaje), EC 39 (hoja bandera visible), EC 58 (todas las espigas fuera de la vaina), EC 75 (madurez lechosa) y EC 94 (madurez comercial). Las plantas fueron trasladadas al laboratorio del CIDEFI, FCAYF, UNLP para su procesamiento, extrayéndose muestras de hojas y tallos en el primero y segundo estadio, de hojas, tallos y glumas en el tercer estadio, de hojas, tallos, glumas y granos en el cuarto estadio y de tallos, glumas y granos en el quinto estadio (de la zona media de cada planta). Las muestras se lavaron con agua corriente, se cortaron en piezas de aprox. 5 mm de diámetro (submuestras) y luego se desinfectaron superficialmente de acuerdo a la técnica de Luginbühl *et al.* (1979). Cinco piezas de cada órgano se sembraron en cajas de Petri conteniendo APG al 2% adicionadas de 250 mg/l de cloranfenicol (Chloromycetin® Parke Davis). Las cajas fueron incubadas en estufa en condiciones de oscuridad a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 9 días, realizándose un seguimiento para observar el crecimiento de los hongos cada 2 o 3 días. Se realizaron 5 repeticiones para cada órgano muestreado en cada estadio y en cada cultivar. La identificación de las

especies y el cálculo de las frecuencias de presencia se llevaron a cabo utilizando la misma metodología y claves taxonómicas mencionadas en el punto 1.3.1.

Análisis estadístico

Los datos de las especies aisladas fueron registrados para cada uno de los estadíos, órganos y cultivares relevados calculándose a partir de ellos las frecuencias de presencia, la cual se determinó como el cociente entre el número de submuestras (segmentos para cada órgano) en las que se aisló un determinado endófito y el número total de submuestras incubadas x 100.

Se realizó un ANAVA incluyendo como variables a los órganos, a los endófitos, cultivares y estadíos fenológicos (como repetición), debido a que se evaluaron diferentes estadíos para cada órgano, y un ANAVA para cada órgano separadamente. Las medias fueron comparadas mediante el test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

1.4. Resultados

1.4.1. Micobiota endofítica de hojas de trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes estadíos con distintas condiciones ambientales

En el ensayo se incubaron 300 segmentos de hojas de trigo del cultivar Klein Dragón en APG al 2% (10 repeticiones x 5 submuestras x 3 estadíos x 2 años) de los que se aislaron 25 especies endófitas correspondiendo 24 a especies fúngicas y 1 a una especie bacteriana.

Los resultados del ANAVA mostraron diferencias significativas en las frecuencias de los endófitos para los años y para los endófitos pero no para los estadíos. Asimismo, las interacciones dobles: año x estadío, año x endófito, estadío x endófito y la triple: año x estadío x endófito fueron significativas (Tabla 1).

Tabla 1. ANAVA de las frecuencias de los endófitos foliares de trigo en el cultivar Klein Dragón, en tres estadíos fenológicos del ciclo del cultivo en dos campañas agrícolas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Año	1	1.02	0.004
Estadío	2	0.01	0.922
Endófito	24	0.38	≤0.001
Repetición	9	0.05	0.931
Año x estadío	2	0.72	0.003
Año x endófito	24	0.23	0.007
Estadío x endófito	48	0.25	≤0.001
Año x estadío x endófito	48	0.29	≤0.001
Error	432	0.12	

* Test de F ($P \leq 0.05$).

Los hongos endófitos aislados fueron identificados mediante observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias y estructuras reproductivas, respectivamente utilizando claves taxonómicas tal como se menciona en el punto 1.3.1. Dos aislamientos endofíticos no esporulantes fueron caracterizadas como Dematiáceas y asignados como micelio estéril (MS). La bacteria aislada fue identificada como *Bacillus* sp. En la Tabla 2 pueden observarse las frecuencias de los endófitos aislados en los diferentes estadíos y años de muestreo.

Tabla 2. Frecuencias de los endófitos foliares de trigo, en el cultivar Klein Dragón en tres estadíos del ciclo del cultivo en dos años

Endófitos	Estadio 1**			Estadio 2			Estadio 3			Promedio total
	Años									
	1	2	Promedio	1	2	Promedio	1	2	Promedio	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	0.00	6.00	3.00	0.00	14.00	7.00	10.00	18.00	14.00	8.00 a***
<i>Alternaria</i> sp.	0.00	10.90	5.80	0.00	0.04	0.02	2.00	0.00	1.00	2.23 cd
<i>Arthrinium</i> sp.	4.00	0.00	2.00	0.00	2.00	1.00	0.00	10.00	5.00	2.67 cd
<i>Aspergillus</i> sp. 1	0.00	12.00	6.00	0.00	2.00	1.00	0.00	2.00	1.00	2.67 cd
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	1.00	0.00	2.00	1.00	0.67 d
<i>Bacillus</i> sp.	0.00	30.00	15.00	4.00	0.00	2.00	4.00	0.00	2.00	6.33 ab
<i>Bipolaris cynodontis</i> (Marig.) Shoem.	0.00	2.00	1.00	4.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	1.00 cd
<i>B. sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem.	0.00	2.00	1.00	2.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.67 d
<i>Bipolaris</i> sp.	0.00	2.00	1.00	6.00	0.00	3.00	2.00	0.00	1.00	1.67 cd
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	1.00	4.00	0.00	2.00	1.00 cd
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.: Fr.) Link	0.00	4.00	2.00	2.00	4.00	3.00	8.00	4.00	6.00	3.67 bc
<i>Cryptococcus</i> sp.	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.67 d
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. y Sacc.	0.00	0.00	0.00	0.00	8.00	4.00	0.00	0.00	0.00	1.34 cd
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	2.00	4.00	0.00	2.00	1.34 cd
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.: Fr.	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.67 d
<i>Helminthosporium</i> sp.	0.00	0.00	0.00	0.00	6.00	3.00	0.00	4.49	2.29	1.76 cd
<i>Penicillium</i> sp.	0.00	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.78	0.99	0.66 d
<i>Phoma</i> sp.	2.00	10.00	6.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00 cd
<i>Phomopsis</i> sp.	2.00	0.00	1.00	0.00	8.00	4.00	0.00	0.00	0.00	1.67 cd
<i>Rhodotorula rubra</i> (Schimon) Harrison	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	1.00	2.00	0.00	1.00	0.67 d
<i>Stemphylium botryosum</i> Wallroth	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	2.00	3.00	1.00 cd
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00	5.00	0.00	0.00	0.00	1.67 cd
<i>Ulocladium</i> sp.	0.00	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33 d
MS 1*	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.33 d
MS 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	2.00	0.67 d
Promedio Endófitos	0.32	3.31		1.36	2.32		1.76	1.77		
Promedio Estadios		1.83 a			1.84 a			1.77 a		
Promedio Años	Año 1			Año 2						
	1.14 a			2.47 b						

*MS: Micelio estéril: Aislamientos endofíticos no esporulantes.; **Estadíos de crecimiento según Zadoks *et al.* (1974): Estadio 1: 32, Estadio 2: 75 y Estadio 3: 85. Los valores corresponden a las medias de 100 secciones de hojas por estadio de crecimiento (5 secciones x 10 repeticiones x 2 años); ***Medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes de acuerdo al Test de F ($P \leq 0.05$). LSD interacción: año x estadio= 0.20 y año x endófito= 0.28.

Tabla 3. Datos climáticos registrados durante los ensayos

Mes	Año 1		
	Temperatura (°C)	media	Humedad (%)
Julio	11.5		90.0
Agosto	10.4		80.0
Septiembre	12.2		88.0
Octubre	16.3		89.0
Noviembre	18.5		76.0
Diciembre	21.0		79.0
Media del período	14.98		83.7
Total			370.2
Mes	Año 2		
	Temperatura (°C)	media	Humedad (%)
Mayo	15.0		82.0
Junio	10.0		77.0
Julio	7.1		71.0
Agosto	12.3		89.0
Septiembre	13.6		88.0
Octubre	16.6		90.0
Noviembre	20.1		82.0
Media del período	15.78		96.5
Total			624.2

Registros meteorológicos de la EEJH, Los Hornos, FCAYF, UNLP. Lat. S 34°59 – Long. O 57° 59. 45 msnm.

Los datos climáticos registrados durante los dos años mostraron diferencias en las condiciones ambientales durante los ciclos de cultivo con mayores precipitaciones acumuladas, mayores porcentajes de humedad media en el segundo año comparadas con las del primer año y con medias de temperatura levemente mayor en el segundo año (Tabla 3).

Como puede observarse en la Tabla 2, un total de 25 especies fueron aisladas de las hojas del trigo en los dos años evaluados, sin embargo pocas especies presentaron altas frecuencias, destacándose *A. alternata* y *Bacillus* sp. Si bien el número de especies aisladas en ambos años fue similar (18 y 19 respectivamente para el primero y segundo año), hubo variaciones cuali-cuantitativas de las especies. Por ejemplo, *A. alternata* y *Bacillus* sp. se aislaron en ambos años pero con mayores frecuencias en el segundo año. A su vez, *C. herbarum*, *C. globosum*, las especies de *Bipolaris*, *Arthrinium* sp., *Alternaria* sp. y *Phoma* sp. estuvieron presentes en ambos años sin embargo, presentaron valores variables en los años. Otras especies solo fueron aisladas en el segundo año como *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp.

2, *C. gloeosporioides*, *Helminthosporium* sp., *Penicillium* sp., *T. hamatum* y *Ulocladium* sp., mientras que *E. nigrum*, *R. rubra*, *Cryptococcus* sp., *F. oxysporum* y MS2 solo fueron registrados en el primer año. Asimismo, algunas especies fueron aisladas en todos los estadios como *A. alternata*, *Bacillus* sp., *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp., *Aspergillus* sp. 1, *Bipolaris* sp. y *C. herbarum*, mientras que otros fueron específicos de un estadio como *Cryptococcus* sp., *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *T. hamatum* y MS1 que solo estuvieron presentes en el estadio 2 y, *S. botryosum* y MS2 solo en el estadio 3 y *Phoma* sp. y *Ulocladium* sp. solo en el estadio 1. Entre los endófitos que estuvieron presentes en los tres estadios pudo observarse que *A. alternata* y *C. herbarum* fueron incrementando progresivamente sus frecuencias de presencia desde el estadio 1 al 3, por el contrario *Bacillus* sp. disminuyó y otros fueron variables entre los estadios. Otras especies, por ejemplo, se aislaron en el segundo y tercer estadio como *Aspergillus* sp. 2, *C. globosum*, *E. nigrum*, *Helminthosporium* sp. y *Rhodotorula rubra* y otros en el 1 y 2 estadio como *B. sorokiniana*., *B. cynodontis* y *Phomopsis* sp.

Por lo mencionado, con estos resultados pudo observarse en este ensayo preliminar que las hojas de trigo hospedan un amplio número de especies endófitas, las cuales varían según las condiciones ambientales reinantes en el sitio del muestro.

1.4.2. Micobiota endofítica del trigo y sus variaciones cuali-cuantitativas en diferentes órganos, estadios del ciclo fenológico del cultivo y en diferentes cultivares

Aislamientos e identificación

Un total de 1750 segmentos de plantas asintomáticas (hojas, tallos, glumas y granos) de 5 cultivares de trigo en 5 estadios fenológicos fueron procesados en el laboratorio. Se obtuvieron 738 aislamientos identificados como 33 microorganismos (Tabla 6), de los cuales 30 correspondieron a especies fúngicas y 3 a especies bacterianas, identificadas como *Bacillus* sp., *Serratia* sp. y *Xanthomonas* sp. Las especies fúngicas aisladas fueron identificadas mediante observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias y estructuras reproductivas, utilizando claves taxonómicas tal como se menciona en el punto 1.3.1. Tres aislamientos endofíticos no esporularon y fueron registrados como micelio estéril (MS) (Tabla 6).

Los granos fueron los órganos que presentaron los mayores porcentajes de infección del total de muestras analizadas (74%) seguidos por los tallos, glumas y las hojas. Sin embargo, el

mayor número de taxa fue registrado en las hojas, seguidas por los tallos, granos y glumas (Tabla 4).

Tabla 4. Muestras de plantas de trigo analizadas en los cinco cultivares en cinco estadios fenológicos

Estadios*	Número de segmentos analizados				
	Código*	Hoja	Tallo	Gluma	Grano
Comienzo de macollaje	20	125	125		
Hoja bandera visible	39	125	125		
Todas las espigas fuera de la vaina	58	125	125	125	
Madurez lechosa	75	125	125	125	125
Madurez comercial	94		125	125	125
Número de muestras analizadas (Total: 1750)		500	625	375	250
Nº de aislamientos (Total: 738)		163	263	127	185
Infección (%)**		32.6	42.08	33.87	74.00
Total de especies aisladas		27	17	12	16

*Estadios de crecimiento según Zadoks *et al.* (1974); **Los porcentajes de infección fueron calculados como el cociente entre el número de aislamientos y las muestras analizadas para cada órgano x 100.

Los resultados del ANAVA incluyendo órganos, endófitos, cultivares y estadios fenológicos (tomados estos últimos como repetición) mostraron que hubo diferencias significativas entre los órganos, los endófitos y la interacción órganos x endófitos (Tabla 5). Las medias de las frecuencias se presentan en la Tabla 6.

Tabla 5. ANAVA de las frecuencias de los endófitos aislados de hojas, tallos, glumas y granos de cinco cultivares de trigo y en cinco estadios fenológicos del cultivo

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Órganos	3	84.50	0.011
Endófitos	32	366.70	≤0.001
Cultivares	4	23.04	0.396
Estadios (repeticiones)	4	52.42	0.055
Organos x endófitos	96	85.62	≤0.001
Organos x cultivares	12	11.76	0.903
Endófitos x cultivares	128	26.16	0.119
Organos x endófitos x cultivares	512	20.93	0.826
Error		22.61	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Tabla 6. Frecuencias de los endófitos aislados de hojas, tallos, glumas y granos en cinco cultivares de trigo en cinco estadios fenológicos

Endófitos	Medias de todos los órganos y estadios
<i>Acremonium</i> sp.	0.06 a*
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keisler	8.48 e*
<i>Alternaria infectoria</i> species-group	0.56 a
<i>Arthrinium</i> sp.	0.58ab
<i>Bacillus</i> sp.	1.26 ab
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem.	0.73 ab
<i>Bipolaris</i> sp. 1	0.00 a
<i>Bipolaris</i> sp. 2	0.26 a
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	0.04 a
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries	0.19 a
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.:Fr.) Link	6.55 d
<i>Cochliobolus spicifer</i> Nelson	0.14 a
<i>Cryptococcus</i> sp.	2.14 b
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijni	0.01 a
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	4.38 c
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	1.01 ab
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.: Fr.	0.53 a
<i>Helicocephalum</i> sp.	0.00 a
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	0.04 a
<i>Penicillium</i> sp.	1.16 ab
<i>Phoma</i> sp.	0.00 a
<i>Pleospora herbarum</i> (Fr.) Raben.	0.00 a
<i>Rhodotorula rubra</i> Harrison	1.27ab
<i>Serratia</i> sp.	8.95 e
<i>Stachybotrys</i> sp.	0.00 a
<i>Stemphylium botryosum</i> Wallroth	0.09 a
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	0.17 a
<i>Ulocladium</i> sp.	0.04 a
MS 1**	0.00 a
MS 2	0.00 a
MS 3	0.38 a
<i>Xanthomonas</i> sp.	4.33 c
<i>Zymoseptoria tritici</i> (Desm.) Quaedvl. & Crous	0.00 a
Cultivares	
Klein Dragon	1.54 a
Buck Pronto	1.37 a
Klein Cobre	1.37 a
Buck Poncho	1.39 a
Pro INTA Federal	0.91 a
Organos	
Hojas	0.94 a
Tallos	1.27 a
Glumas	0.98 a
Granos	2.03 b

*Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test de F ($P \leq 0.05$); **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulantes.

Los microorganismos más frecuentemente aislados de los órganos del trigo fueron *Serratia* sp., *A. alternata*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Xanthomonas* sp., *Cryptococcus* sp., *R. rubra*, *Bacillus* sp., *Penicillium* sp. y *F. graminearum*. Como puede verse, los granos presentaron las medias de frecuencia más altas de endófitos siguiéndole los tallos. Numerosas especies fueron aisladas de los diferentes órganos del trigo, sin embargo pocas especies se registraron con altas frecuencias (Tabla 6). Si bien la mayoría de las especies siguieron similares modelos en los 4 órganos, se observaron variaciones cuali-cuantitativas de los endófitos destacándose *A. alternata* con altos valores en granos y glumas, *C. herbarum*, *E. nigrum* y *Xanthomonas* sp. en granos y *Serratia* sp. con más altos valores en tallos, glumas y granos que en hojas (Figura 11).

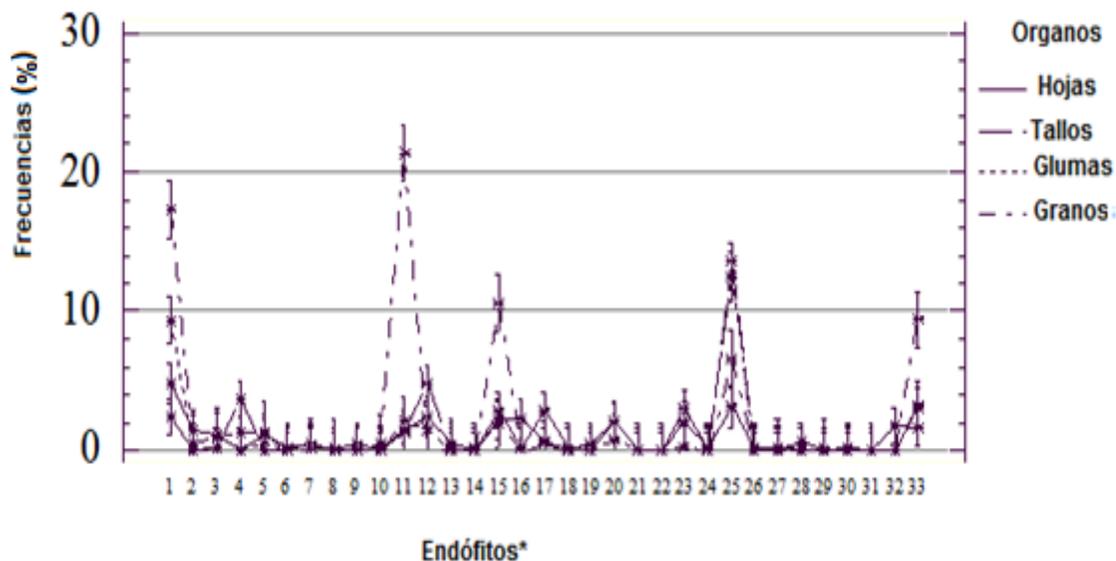


Figura 11. Frecuencia de los endófitos aislados de cuatro órganos del trigo.

*Endófitos: 1: *Alternaria alternata*; 2: *A. infectoria*; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Bacillus* sp.; 5: *B. sorokiniana*; 6: *Bipolaris* sp.1; 7: *Bipolaris* sp. 2; 8: *Candida albicans*; 9: *Acremonium* sp. (=Cephalosporium sp.); 10: *Chaetomium globosum*; 11: *Cladosporium herbarum*; 12: *Cryptococcus* sp.; 13: *Cochliobolus spicifer*, sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Epicoccum nigrum*; 16: *Fusarium oxysporum*; 17: *F. graminearum*; 18: *Helicocephalum* sp.; 19: *Nigrospora sphaerica*; 20: *Penicillium* sp., 21: *Phoma* sp.; 22: *Pleospora herbarum*; 23: *Rhodotorula rubra*; 24: *Zymoseptoria tritici*; 25: *Serratia* sp.; 26: *Stachybotrys* sp.; 27: *Stemphylium botryosum*; 28: *Trichoderma hamatum*; 29: *Ulocladium* sp.; 30: MS* 1; 31: MS 2; 32: MS3; 33: *Xanthomonas* sp. **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulantes.

Los resultados del ANAVA para cada órgano separadamente se muestran en la Tabla 7 y los valores de las medias en la Tabla 8.

Tabla 7. ANAVA de las frecuencias de los endófitos en cada órgano del trigo en cinco cultivares y en diferentes estadios fenológicos

Fuente de variación	Hoja			Tallo		Gluma		Grano	
	Grados de libertad	Cuadra do medio	P<F*	Cuadra do medio	P<F	Cuadra do medio	P<F	Cuadra do medio	P<F
	<i>Repeticiones</i>	4	22.57	0.5306	70.69	0.1252	15.11	0.6860	39.15
Endófitos	32	152.50	≤0.001	828.30	≤0.001	552.48	≤0.001	1358.24	≤0.001
Estadios	4	221.85	≤0.001	218.81	≤0.001	547.39	≤0.001	512.97	0.0032
Cultivares	4	9.70	0.8511	26.57	0.6071	72.08	0.0288	99.15	0.1510
Endófitos x estadios	128	126.93	≤0.001	202.56	≤0.001	399.06	≤0.001	454.97	≤0.001
Endófitos x cultivares	128	78.01	≤0.001	86.57	≤0.001	63.33	≤0.001	169.12	≤0.001
Estadios x cultivares	16	47.55	0.0677	47.78	0.2439	26.99	0.4228	82.67	0.2301
Endófitos x estadios x cultivares	512	75.24	≤0.001	79.28	≤0.001	71.36	≤0.001	125.91	≤0.001
Error		28.52		39.18		26.60		58.84	

* Test de F ($P \leq 0.05$).

Tabla 8. Frecuencias medias de los endófitos aislados de hojas, tallos, glumas y granos en cinco cultivares de trigo

Endófitos	Hojas	Tallos	Glumas	Granos	Medias*
<i>Acremonium</i> sp. (= <i>Cephalosporium</i> sp.)	0.00 a	0.48 abc	0.00 a	0.00 a	0.06 a
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keisler	4.80 e*	2.40 efg	9.33 e	17.60 d	8.48 e
<i>Alternaria infectoria</i> species-group	1.40 abc	0.00 a	0.26 ab	0.80 a	0.56 a
<i>Arthrinium</i> sp.	1.20 abc	0.16 ab	0.00 a	1.20 a	0.58 ab
<i>Bacillus</i> sp.	0.00 a	3.68 gh	0.00 a	1.60 a	1.26 ab
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem.	1.00 abc	0.00 a	0.53 abc	1.60 a	0.73 ab
<i>Bipolaris</i> sp. 1	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
<i>Bipolaris</i> sp. 2	0.40 a	0.48 abc	0.00 a	0.40 a	0.26 a
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.40 a	0.04 a
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.80 a	0.19 a
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.:Fr.) Link	1.40 abc	1.28 abcde	2.13 cd	21.6 e	6.55 d
<i>Cryptococcus</i> sp.	2.40 cd	4.80 h	1.60 abc	0.00 a	2.14 b
<i>Cochliobolus spicifer</i> Nelson	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.40 a	0.14 a
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	0.40 a	0.00 a	0.26 ab	0.00 a	0.01 a
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	3.00 d	2.88 fg	1.86 bc	10.80 c	4.38 c
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.: Fr.	2.20 cd	0.16 ab	0.00 a	0.00 a	0.53 a
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	1.00 abc	2.88 fg	0.00 a	0.80 a	1.01 ab
<i>Helicocephalum</i> sp.	0.00 a	0.16 ab	0.00 a	0.00 a	0.00 a
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0.40 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.04 a
<i>Penicillium</i> sp.	2.00 bcd	2.08 def	0.80 abc	0.00 a	1.16 ab
<i>Phoma</i> sp.	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
<i>Pleospora herbarum</i> (Fr.) Raben.	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a

<i>Rhodotorula rubra</i> Harrison	2.40 cd	3.04 fg	0.26 ab	0.00 a	1.27 ab
<i>Serratia</i> sp.	3.30 d	13.60 l	12.53 f	6.80 b	8.95 e
<i>Stachybotrys</i> sp.	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
<i>Stemphylium botryosum</i> Wallroth	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.40 a	0.09 a
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	0.60 ab	0.64 abcd	0.26 ab	0.00 a	0.17 a
<i>Ulocladium</i> sp.	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.40 a	0.04 a
<i>Xanthomonas</i> sp.	3.00 d	1.60 bcdef	3.73 d	9.60 bc	4.33 c
<i>Zymoseptoria tritici</i> (Desm.) Quadvl. & Crous	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
MS 1**	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00a	0.00 a
MS 2	0.20 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
MS 3	0.00 a	1.76 cdef	0.00 a	0.00 a	0.38 a
Medias	0.98 a	1.27 a	1.01 a	2.27 b	
Cultivares					
Klein Dragon	0.90 a	1.21 a	1.53 c	2.73 a	1.59 a
Buck Pronto	1.09 a	1.01 a	0.89 ab	2.73 a	1.43 a
Klein Cobre	0.83 a	1.40 a	1.31 bc	2.18 a	1.43 a
Buck Poncho	1.12 a	1.26 a	1.05 abc	2.36 a	1.45 a
Pro INTA Federal	0.97 a	1.48 a	0.48 a	1.39 a	1.08 a
Estadíos***					
20	0.73 a	0.85 a			
39	0.65 a	2.16 b			
58	0.80 a	1.02 a			
75	1.76 b	1.26 a	1.87 c	1.72 a	
94		1.09 a	0.94 b	2.83 b	

*Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test de F ($P \leq 0.05$); **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulante; ***Estadíos de crecimiento de acuerdo a la escala de Zadoks *et al.* (1974).

Endófitos foliares

Hubo diferencias significativas entre los endófitos y los estadíos, no así para los cultivares. Las interacciones endófitos \times estadíos, endófitos \times cultivares y la triple interacción endófitos \times estadíos \times cultivares fueron significativas (Tabla 7). Los endófitos aislados con mayores frecuencias de las hojas fueron *A. alternata*, *Serratia* sp. *E. nigrum*, *Xanthomonas* sp., *Cryptococcus* sp., *R. rubra* y *F. oxysporum*, entre otras especies (Tabla 8). Las mayores frecuencias de endófitos fueron registradas en el estadio 75 (grano lechoso).

La interacción endófitos \times estadíos y endófitos \times cultivares se debió a la diferente frecuencia de los endófitos según el estadio o el cultivar. Por ejemplo, *A. alternata* y *Xanthomonas* sp. que tuvieron altas frecuencias en el estadio 75 y *Serratia* sp. en el 20 (Figura 12). *F. oxysporum* se aisló con valores más altos en el cultivar B. Poncho, *Cryptococcus* sp. en Pro INTA Federal, *Xanthomonas* sp. en B. Pronto mientras que *A. alternata* en K. Dragón (no mostrado).

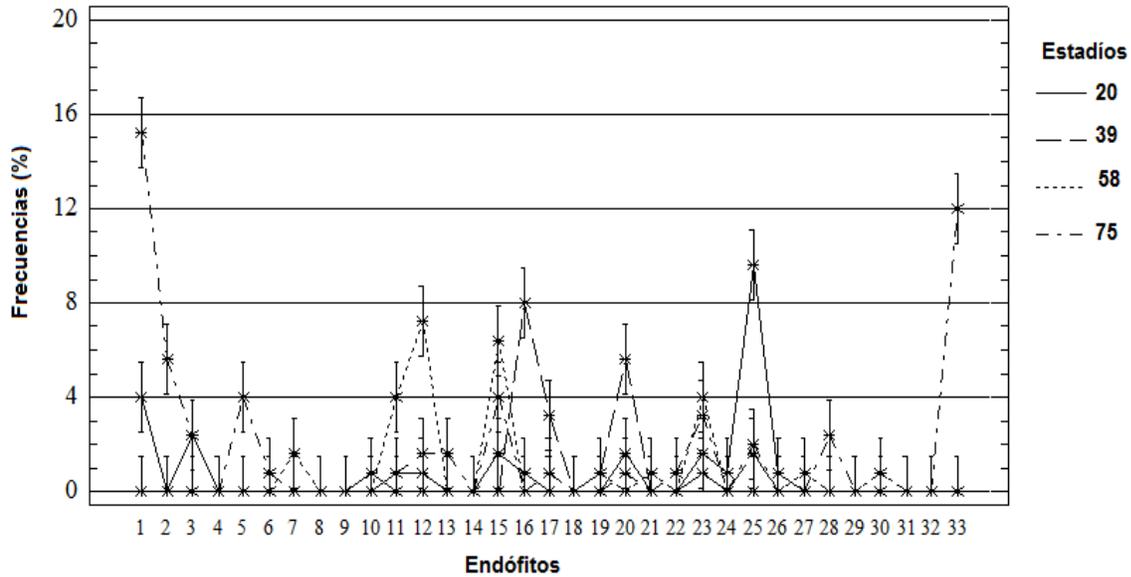


Figura 12. Frecuencia de los endófitos foliares en cuatro estadios del trigo

*Endófitos: 1: *Alternaria alternata*; 2: *A. infectoria*; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Bacillus* sp.; 5: *B. sorokiniana*; 6: *Bipolaris* sp.1; 7: *Bipolaris* sp. 2; 8: *Candida albicans*; 9: *Acremonium* sp. (=Cephalosporium sp.); 10: *Chaetomium globosum*; 11: *Cladosporium herbarum*; 12: *Cryptococcus* sp.; 13: *Cochliobolus spicifer*, sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Epicoccum nigrum*; 16: *Fusarium oxysporum*; 17: *F. graminearum*; 18: *Helicocephalum* sp.; 19: *Nigrospora sphaerica*; 20: *Penicillium* sp., 21: *Phoma* sp.; 22: *Pleospora herbarum*; 23: *Rhodotorula rubra*; 24: *Zymoseptoria tritici*; 25: *Serratia* sp.; 26: *Stachybotrys* sp.; 27: *Stemphylium botryosum*; 28: *Trichoderma hamatum*; 29: *Ulocladium* sp.; 30: MS*1; 31: MS2; 32: MS3; 33: *Xanthomonas* sp. **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulantes.

Endófitos de tallos

Para los tallos, hubo diferencias significativas entre los endófitos y los estadios y en las interacciones endófitos × estadios, endófitos × cultivares y endófitos × estadios × cultivares (Tabla 7). Los endófitos más frecuentes de tallos fueron *Serratia* sp., *Cryptococcus* sp., *Bacillus* sp., *R. rubra*, *E. nigrum*, *F. graminearum*, *A. alternata*, MS3, *Xanthomonas* sp. y *C. herbarum* (Tabla 8). Las frecuencias más altas de endófitos fueron registradas en el estadio 39. Las interacciones endófitos × cultivar y endófitos × estadios fueron significativas ya que hubo diferencias de frecuencias según el cultivar y el estadio. Por ejemplo, *Bacillus* sp. y *R. rubra* se encontraron en más altas frecuencias en el estadio 75 mientras que otros como *Serratia* sp. y *Cryptococcus* sp. en el estadio 20 (Figura 13). Por otro lado, *A. alternata* mostró altos valores para el cultivar Buck Pronto, *Serratia* sp. en ProINTA Federal y *Cryptococcus* sp. en Buck Poncho, mientras que BA fue solo aislada en altas frecuencias en cultivar Klein Cobre (no mostrado).

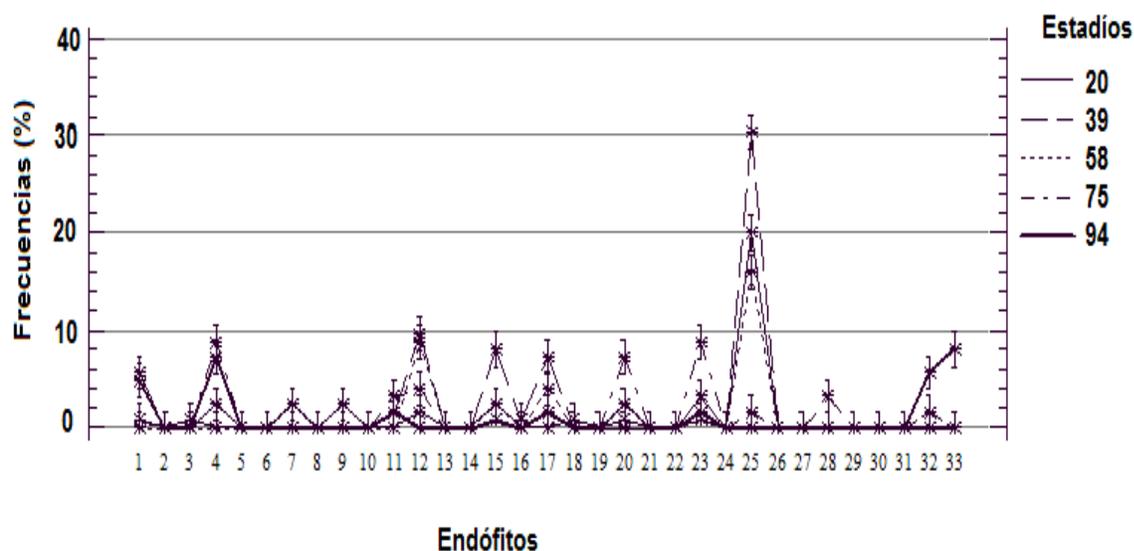


Figura 13. Frecuencia de los endófitos de tallos de trigo en cuatro estadios.

*Endófitos: 1: *Alternaria alternata*; 2: *A. infectoria*; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Bacillus* sp.; 5: *B. sorokiniana*; 6: *Bipolaris* sp.1; 7: *Bipolaris* sp. 2; 8: *Candida albicans*; 9: *Acremonium* sp. (= *Cephalosporium* sp.); 10: *Chaetomium globosum*; 11: *Cladosporium herbarum*; 12: *Cryptococcus* sp.; 13: *Cochliobolus spicifer*, sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Epicoccum nigrum*; 16: *Fusarium oxysporum*; 17: *F. graminearum*; 18: *Helicocephalum* sp.; 19: *Nigrospora sphaerica*; 20: *Penicillium* sp.; 21: *Phoma* sp.; 22: *Pleospora herbarum*; 23: *Rhodotorula rubra*; 24: *Zymoseptoria tritici*; 25: *Serratia* sp.; 26: *Stachybotrys* sp.; 27: *Stemphylium botryosum*; 28: *Trichoderma hamatum*; 29: *Ulocladium* sp.; 30: MS*1; 31: MS2; 32: MS3; 33: *Xanthomonas* sp. **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulantes.

Endófitos de glumas

Para las glumas hubo diferencias significativas entre los endófitos, estadios, cultivares y en las interacciones endófitos × estadios, endófitos × cultivares y endófitos × estadios × cultivares (Tabla 7). Los endófitos aislados más frecuentemente fueron *Serratia* sp., *A. alternata*, *Xanthomonas* sp., *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Cryptococcus* sp., *Penicillium* sp. y *B. sorokiniana*. Las mayores frecuencias se observaron en el estadio 75 seguido por el 94 y el 58. Las diferencias significativas entre los cultivares fueron debidas a que Klein Dragón mostró las más altas frecuencias de endófitos seguido por Klein Cobre y Buck Poncho (Tabla 8). La mayoría de los endófitos mostraron similares valores de frecuencia en todos los estadios, si bien hubo leves variaciones, como por ejemplo, *A. alternata* se presentó con mayor frecuencia en el estadio 94 y *Serratia* sp. en 75 (Figura 14). Asimismo, las frecuencias de aislamiento de los endófitos fueron similares para los cultivares aunque algunos de ellos mostraron

incrementos en sus valores, por ejemplo, *Serratia* sp. en Buck Pronto y *A. alternata* en Klein Cobre (no mostrado).

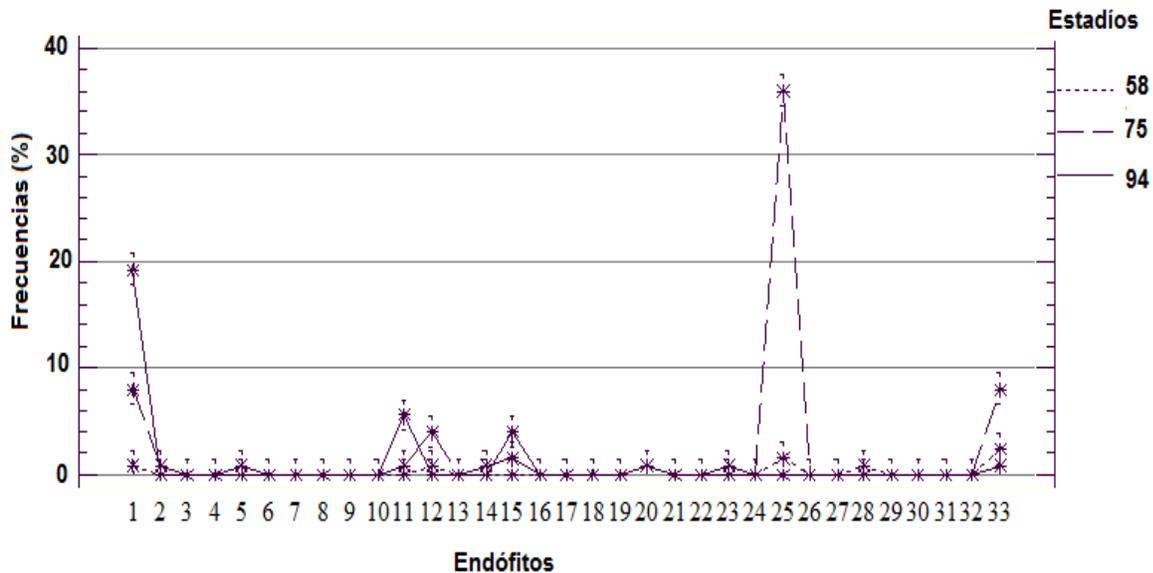


Figura 14. Frecuencia de los endófitos de glumas en cuatro estadios.

*Endófitos: 1: *Alternaria alternata*; 2: *A. infectoria*; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Bacillus* sp.; 5: *B. sorokiniana*; 6: *Bipolaris* sp.1; 7: *Bipolaris* sp. 2; 8: *Candida albicans*; 9: *Acremonium* sp. (= *Cephalosporium* sp.); 10: *Chaetomium globosum*; 11: *Cladosporium herbarum*; 12: *Cryptococcus* sp.; 13: *Cochliobolus spicifer*, sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Epicoccum nigrum*; 16: *Fusarium oxysporum*; 17: *F. graminearum*; 18: *Helicocephalum* sp.; 19: *Nigrospora sphaerica*; 20: *Penicillium* sp.; 21: *Phoma* sp.; 22: *Pleospora herbarum*; 23: *Rhodotorula rubra*; 24: *Zymoseptoria tritici*; 25: *Serratia* sp.; 26: *Stachybotrys* sp.; 27: *Stemphylium botryosum*; 28: *Trichoderma hamatum*; 29: *Ulocladium* sp.; 30: MS*1; 31: MS2; 32: MS3; 33: *Xanthomonas* sp. **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulantes.

Endófitos de granos

Para los granos hubo diferencias significativas entre los endófitos, estadios y en las interacciones endófitos × estadios, endófitos × cultivares y endófitos × estadios × cultivares (Tabla 7). Los endófitos aislados con mayor frecuencia fueron *C. herbarum*, *A. alternata*, *E. nigrum*, *Xanthomonas* sp., *Serratia* sp. y *B. sorokiniana*. Respecto a los estadios, se observaron mayores frecuencias de aislamientos en el estadio 94 que en el 75 (Tabla 8). La mayoría de los endófitos mostraron similares valores en los estadios, si bien algunas especies se presentaron más abundantemente en el estadio 94 (*A. alternata*, *C. herbarum* y *E. nigrum*) y otros en 75 (*Serratia* sp. y *Xanthomonas* sp.) (Figura 15). En los cultivares, *A. alternata* y *Serratia* sp. se presentaron con mayores frecuencias en Klein Dragón, *E. nigrum* en B. Pronto, *Xanthomonas*

sp. en K. Cobre, *B. sorokiniana* en B. Poncho y *C. herbarum* en B. Pronto y B. Poncho (no mostrado).

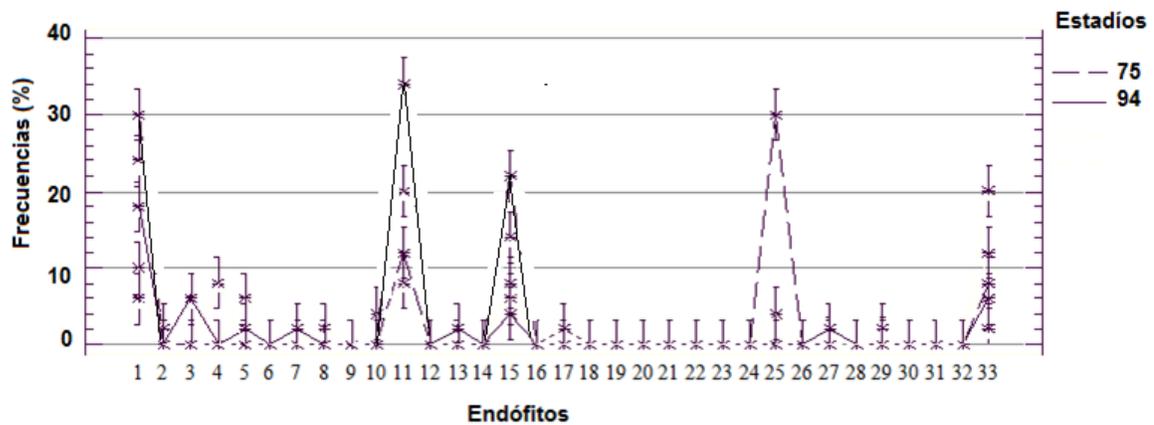


Figura 15. Frecuencia de los endófitos de granos en dos estadios fenológicos.

*Endófitos: 1: *Alternaria alternata*; 2: *A. infectoria*; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Bacillus* sp.; 5: *B. sorokiniana*; 6: *Bipolaris* sp.1; 7: *Bipolaris* sp.2; 8: *Candida albicans*; 9: *Acremonium* sp. (=Cephalosporium sp.); 10: *Chaetomium globosum*; 11: *Cladosporium herbarum*; 12: *Cryptococcus* sp.; 13: *Cochliobolus spicifer*, sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Epicoccum nigrum*; 16: *Fusarium oxysporum*; 17: *F. graminearum*; 18: *Helicocephalum* sp.; 19: *Nigrospora sphaerica*; 20: *Penicillium* sp.; 21: *Phoma* sp.; 22: *Pleospora herbarum*; 23: *Rhodotorula rubra*; 24: *Zymoseptoria tritici*; 25: *Serratia* sp.; 26: *Stachybotrys* sp.; 27: *Stemphylium botryosum*; 28: *Trichoderma hamatum*; 29: *Ulocladium* sp.; 30: MS* 1; 31: MS 2; 32: MS3; 33: *Xanthomonas* sp. **MS: Micelio estéril. Aislamientos endofíticos no esporulantes.

En síntesis, en trigo se han registrado diversas especies endófitas, las cuales presentaron variaciones cuali-cuantitativas en los cultivares, en los órganos, en los estadios y según las condiciones ambientales del sitio de muestreo. La mayoría de las especies pertenecieron al Phylum Ascomycota, distribuidas principalmente en la clase Dothidiomycetes y en menor proporción a las clases Sordariomycetes y Eurotiomycetes. El espectro de especies aisladas incluyó potenciales saprófitos, posibles simbioses naturales y especies de conocidos patógenos.

2. MICROBIOTA ENDOFITICA ASOCIADA A LA SOJA

2.1. Antecedentes en soja

Los estudios que abordan a los microorganismos endófitos de la soja, desde sus inicios se han enfocado en los *patógenos latentes*, los cuales han sido incluidos dentro de la definición amplia de endófitos mencionada al comienzo de esta tesis. Estas infecciones latentes ocasionadas por patógenos son consideradas uno de los más altos niveles de parasitismo debido a la coexistencia temporal del hospedante y el parásito, con un mínimo daño hacia el hospedante (Sinclair, 1991). En éstas, las infecciones endofíticas son asintomáticas en la estación de crecimiento del cultivo sin embargo, hacia el final del ciclo o por muerte de tejidos o por condiciones ambientales favorables para el patógeno, se manifiestan ocasionando daños en la calidad y los rendimientos de granos de soja. Por ello, las infecciones latentes son considerandas relevantes en epidemiología, en el control de enfermedades de las plantas y en el mejoramiento para el logro de resistencias o tolerancias frente a patógenos (Sinclair, 1991).

En este sentido, diversos autores se han enfocado en las detecciones tempranas de patógenos latentes de importancia en plantas y semillas de soja evaluando diferentes metodologías para su estudio, tales como histológicos, bioensayos, técnicas serológicas y análisis de ultrasonido (Cerkauskas *et al.*, 1983; Walcott *et al.*, 1998). Asimismo, el uso de herbicidas no selectivos como el paraquat y el glifosato, los cuales históricamente se han utilizado como desecantes de la vegetación previo a la cosecha y para el control de malezas, han favorecido la detección de estos patógenos en laboratorio. Estudios realizados demostraron que la aplicación de estos herbicidas estimulan la esporulación de patógenos latentes. Entre ellos, se han detectado tempranamente patógenos como *Colletotrichum truncatum*, causante de la antracnosis en soja y especies de *Phomopsis*, que ocasionan el tizón del tallo y de la vaina, cancrrosis en tallos e impactan en la germinación y el vigor de la semilla ocasionando muerte en pre y post emergencia (Cerkauskas *et al.*, 1983).

Otras investigaciones fueron realizadas en Brasil, utilizando un cultivar originario de esa región, con fines de comparar las poblaciones endofíticas presentes en hojas y tallos de plantas de soja creciendo en el campo y en invernáculos a partir de muestras tomadas en un estadio vegetativo (V3) y uno reproductivo (R2). Estos estudios demostraron que las plantas provenientes del campo presentaron mayor número de aislamientos que las del invernáculo sin encontrar diferencias entre el número de especies aisladas de las hojas y tallos, si bien con una leve tendencia mayor en las hojas. Los endófitos dematiaceos fueron los endófitos más

frecuentemente aislados, en particular a partir de las plantas procedentes del campo (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Scopulariopsis*). Otras especies aisladas correspondieron a géneros no-dematiáceos como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Penicillium*. Asimismo, estos autores encontraron variaciones en el número de aislamientos con la edad de las plantas y entre las provenientes del campo y del invernáculo, así como sugirieron una ocupación preferencial de algunos grupos por ciertos órganos vegetales (Chapaval Pimentel *et al.*, 2006).

Por su parte, estudios realizados en Mississippi analizaron la microbiota endofítica de hojas, tallos y vainas de soja a lo largo del ciclo del cultivo y en dos campañas agrícolas diferentes encontrando variaciones según el año, que en todos los órganos las especies más frecuentes fueron las mismas si bien se presentaron en diferente orden según el órgano y que algunas de éstas aumentaron y otras disminuyeron sus frecuencias con el avance del ciclo del cultivo (Miller y Roy, 1982). Estos autores han sugerido que las condiciones ambientales reinantes en los años evaluados afectan las frecuencias de las especies endófitas en plantas de soja.

En investigaciones recientemente realizadas en Minnesota, Estados Unidos, se comparó la eficiencia de dos técnicas para la identificación de los hongos endófitos a partir de tallos de soja desinfectados superficialmente. En ellos, se evaluó la utilización de técnicas tradicionales, dependientes del aislamiento e incubación en medios de cultivo y la extracción directa de ADN del tallo. Interesantemente, los resultados de estas investigaciones les permitieron a los autores arribar a la conclusión que con el uso de la metodología tradicional obtuvieron una mayor diversidad de especies endófitas (Impullitti y Malvik, 2013).

En nuestro país pueden mencionarse estudios preliminares realizados por Formento y Schutt de Varini (2009) en hojas de soja, realizado con el objetivo de detectar patógenos tempranamente a partir de plantas asintomáticas y los de Larran *et al.* (2002b), conducidos con la finalidad de registrar los hongos endófitos en hojas de soja y analizar sus posibles cambios cuali-cuantitativos en estadios reproductivos. En estos estudios se aislaron e identificaron 12 géneros fúngicos destacándose por sus frecuencias *A. alternata* y *Glomerella cingulata*, los cuales estuvieron presentes en frecuencias similares en los dos estadios evaluados (R2-R3 y R4-R5).

De acuerdo a lo mencionado, y debido a la ausencia de estudios que aborden la diversidad de las comunidades endofíticas de diferentes órganos de la soja y de su dinámica a lo largo del ciclo de cultivo asociadas a cultivares creciendo en las condiciones agroecológicas de la región productora de Argentina, se proponen los siguientes objetivos:

2.2. Objetivos

- Determinar las frecuencias de infección de microorganismos endófitos, principalmente especies fúngicas, en plantas asintomáticas de soja.

- Analizar la existencia de cambios cuali-cuantitativos de las comunidades endofíticas en diversos órganos de la soja (hoja, tallo, vaina y grano), en diferentes estadios a lo largo del ciclo fenológico del cultivo y en distintas campañas agrícolas con diferentes condiciones ambientales.

2.3. Materiales y métodos

Se diseñó un ensayo a fines de analizar las comunidades endofíticas fúngicas de las plantas de soja, su dinámica espacial (preferencia por órganos) y temporal (a lo largo del ciclo fenológico del cultivo) y, las posibles variaciones cuali-cuantitativas en condiciones ambientales diferentes.

2.3.1. Relevamiento, aislamiento y caracterización de endófitos de diferentes órganos de la soja en seis estadios del ciclo fenológico del cultivo en condiciones ambientales diferentes

En la EEJH de la FCAyF, UNLP, se sembraron semillas del cultivar DM 3810 en parcelas de 2.10 m x 5 m (3 líneas a distancia de 0.70 m). Las muestras fueron tomadas de plantas en los siguientes estadios vegetativos y reproductivos de acuerdo a la escala de Fehr y Caviness (1977): V1 (primer nudo, cuando el par de hojas opuestas unifoliadas están totalmente expandidas y en el nudo inmediato superior se observa a la primer hoja trifoliada en las que sus bordes no se tocan), V5 (quinto nudo, la hoja trifoliada del nudo (5) está desarrollada y en el nudo inmediato superior el borde de c/u de los foliolos no se tocan), V7 (séptimo nudo, la hoja trifoliada del nudo (7) está desarrollada y en el nudo inmediato superior el borde de c/u de los foliolos no se tocan), R4 (vainas totalmente desarrolladas: una vaina de 2 cm en uno de los 4 nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas), R6 (semilla completamente desarrollada: una vaina en cualquiera de los cuatro nudos superiores del tallo principal contiene una semilla verde que llena la cavidad de dicha vaina, con hojas totalmente desplegadas) y R8 (maduración completa: el 95% de las vainas de la planta han

alcanzado el color de madurez). En cada uno de estos estadíos se tomaron 25 plantas asintomáticas que fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio del CIDEFI, FCAyF, UNLP para su procesamiento. A partir de la zona media de cada una de ellas se extrajeron muestras de hojas, tallos y vainas, según estadíos. De esta manera, en V1, V5 y V7 se muestrearon hojas y tallos, en R4 y R6 hojas, tallos y vainas y en R8, vainas y granos dado el estado de senescencia de las hojas y tallos. Las muestras se lavaron previamente en agua corriente, se cortaron en piezas de aprox. 5 mm de diámetro (submuestras) y luego se desinfectaron superficialmente de acuerdo a la técnica de Luginbühl *et al.* (1979). La incubación se realizó en APG al 2% colocando 5 piezas en cada placa de Petri en estufa en condiciones de oscuridad a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 9 días, realizándose un seguimiento para observar el crecimiento de los hongos cada 2 o 3 días. El ensayo fue realizado en dos campañas agrícolas diferentes.

La identificación de las especies fúngicas se realizó, sobre la base de las características de los cultivos (forma, color, textura, reverso) y morfobiométricas de las estructuras reproductivas, directamente por observación macroscópica y microscópica. En algunos casos se realizaron repiques a diferentes medios de cultivo de uso rutinario en laboratorio, incubaciones con fotoperíodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad para inducir la esporulación y en otros casos se efectuaron microcultivos para observar las características de las hifas, la ontogenia conidial y su morfología, tal como se detalla en el punto 1.3.1. Para la identificación de las especies se utilizó bibliografía específica siendo confirmada por colegas especialistas del Centro de investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP. Se utilizaron, entre otras, las claves taxonómicas de: Ellis (1971; 1976), Leslie y Summerell (2006) para especies del género *Fusarium* en particular, Manamgoda *et al.* (2012; 2014), Sinevanesan (1987), Sutton (1980) para identificación de coelomycetes, Woudenberg *et al.* (2013) para especies de *Alternaria*, Samuels (2006) para especies de *Trichoderma* y las Descripciones de Hongos y Bacterias del International Mycological Institute (IMI) del Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI).

Análisis estadístico

Los datos fueron registrados para cada uno de los estadíos, órganos y años evaluados, calculándose las frecuencias de infección como el cociente entre el número de submuestras en las que se aisló un determinado endófito y el número total de muestras incubadas en cada placa de Petri x 100. Se realizó un ANAVA combinado con los datos de ambos años, estadíos fenológicos y órganos para el análisis de los estados vegetativos y reproductivos separadamente. Cada placa de Petri fue considerada como una muestra (total 25). Para el

análisis estadístico se consideraron 5 repeticiones (cada una integrada por 5 submuestras). Los datos fueron transformados (arcoseno \sqrt{x}) para estabilizar la varianza residual y ajustar los datos a una distribución normal. Para la comparación de medias se realizó el Test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

Los datos obtenidos de las frecuencias de los endófitos en las vainas del estadio R8 fueron analizados separadamente, realizándose un diseño factorial considerando como factores a los endófitos y años con 25 repeticiones (cada una con 5 submuestras). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

2.3.2. Micobiota endofítica de las semillas de soja

Para analizar la micobiota endofítica de las semillas de soja y sus posibles cambios cuali-cuantitativos en los años evaluados se cosecharon al azar semillas sanas del cultivar Don Mario 3810 en el estadio R8. Luego fueron trasladadas al laboratorio y se desinfectaron utilizando la técnica de Luginbühl *et al.* (1979), colocándose en APG al 2%. Se de a 5 semillas por caja de Petri. La incubación se realizó en estufa en condiciones de oscuridad a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 9 días, realizándose un seguimiento para observar el crecimiento de los hongos cada 2 o 3 días. El ensayo consistió en 5 cajas de Petri, con 4 repeticiones de 5 submuestras cada una, analizándose un total de 100 semillas para cada año. Con los datos transformados (arcoseno \sqrt{x}) se realizó un ANAVA y para la comparación de medias se utilizó el Test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

2.4. Resultados

2.4.1. Relevamiento, aislamiento y caracterización de endófitos de diferentes órganos de la soja en seis estadios del ciclo fenológico del cultivo en condiciones ambientales diferentes

Un total de 1625 segmentos de plantas de soja fueron analizados a partir de los diferentes órganos, estadios y en cada una de las campañas agrícolas evaluadas (total: 3250), obteniéndose 1606 aislamientos, identificados como 41 especies. Los mayores porcentajes de infección por superficie analizada correspondieron a las vainas (Tabla 9).

Tabla 9. Órganos de soja analizados

	Número de segmentos analizados			
	Estadio: código*	Hoja	Tallo	Vaina
	V1	125	125	
	V5	125	125	
	V7	125	125	
	R4	125	125	125
	R6	125	125	125
	R8			125
Número de muestras analizadas/año (Total: 1625)		625	625	375
Nº de muestras analizadas x 2 años (total: 3250)		1250	1250	750
Nº de aislamientos totales (1606):		435	628	543
Año 1 (Total 536)		145	208	183
Año 2 (Total 1070)		290	420	360
Infección (%)**				
Año 1		23.20	33.28	48.80
Año 2		46.40	67.20	96.00
Nº de especies endófitas aisladas:				
Año 1: 32				
Año 2: 31				
Total de especies aisladas por órgano		29	34	27

*Códigos de estadios según Fehr y Caviness (1977); **Los porcentajes de infección fueron calculados como el cociente entre el número de aislamientos y las muestras analizadas para cada órgano x 100.

Los resultados de los ANAVA para los estados vegetativos y reproductivos de ambos años separadamente se muestran en la Tabla 10. Como puede verse, hubo diferencias significativas entre años solo en el estado reproductivo, para los órganos en el estado vegetativo y, para los estadios y endófitos en ambos estados. A su vez, algunas interacciones fueron significativas en ambos estados como años x endófitos, estadios x endófitos y órganos x endófitos mientras que las interacciones años x estadios, años x órganos y estadios x órganos solo fueron significativas en el estado reproductivo. Todas las interacciones triples, excepto años x estadios x órganos, y la cuádruple fueron significativas en ambos estados.

Tabla 10. ANAVA para las frecuencias de los endófitos de soja en dos años, tres estadíos vegetativos del ciclo fenológicos del cultivo en hojas y tallos.

Fuente de variación	Estado vegetativo			Estado reproductivo		
	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P
<i>Experimentos</i>	4	5.49				
Años	1	50.41	0.060	1	1793.66	≤0.001
Estadíos	2	193.22	≤0.001	1	732.98	≤0.001
Órganos	1	521.72	≤0.001	2	50.06	0.015
Endófitos	40	271.68	≤0.001	40	682.45	≤0.001
Años × estadíos	2	39.04	0.064	1	165.82	≤0.001
Años × órganos	1	10.43	0.392	2	92.45	≤0.001
Años × endófitos	40	74.84	≤0.001	40	479.67	≤0.001
Estadíos × órganos	2	3.37	0.789	2	63.64	0.005
Estadíos × endófitos	80	89.75	≤0.001	40	253.89	≤0.001
Organos × endófitos	40	62.39	≤0.001	80	104.31	≤0.001
Años × estadíos × órganos	2	30.34	0.119	2	1.23	0.902
Año × estadíos × endófitos	80	61.52	≤0.001	40	218.40	≤0.001
Años × órganos × endófitos	40	41.05	≤0.001	80	60.49	≤0.001
Estadíos × órganos × endófitos	80	35.46	≤0.001	80	43.85	≤0.001
Años × estadíos × órganos × endófitos	80	25.32	≤0.001	80	41.09	≤0.001
Error	1964	14.21		1964	11.96	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

En la Tabla 11 se presentan las medias de las frecuencias de los endófitos aislados de las hojas y tallos de soja en los estadíos V1, V5 y V7 en los dos años evaluados. Como puede verse, 34 especies endófitas fueron aisladas de los tejidos de soja en el estado vegetativo. Se destacaron por sus frecuencias de aislamiento los endófitos *Penicillium* sp., *A. alternata*, *Cryptococcus* sp., *Trichoderma aureoviride* y *T. koningii*.

Tabla 11. Medias de las frecuencias de los endófitos aislados de dos órganos de la soja en tres estadios vegetativos en dos años

Endófitos	V1		Año 1				V1		Año 2				Promedio
	V5		V7		V5		V7		V5		V7		
	Hojas	Tallos											
<i>Alternaria alternata</i>	2.4	0	0.8	0	4.0	2.4	0.8	0	0	0.8	12.0	9.6	2.73
<i>Alternaria</i> sp.	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Arthrinium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0.8	0.13
<i>Aspergillus niger</i> van Tiegh	0	0	0	0	0.8	0	4.0	6.4	0.8	1.6	0	1.6	1.27
<i>Aspergillus</i> sp.1	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0	0.8	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13
<i>Aspergillus</i> sp. 4	0	0	0	0	0	0	0	5.6	0	0.8	0	0	0.53
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Schoem.	0	0.8	0.8	0.8	0.8	0	4.8	4.0	0	0.8	1.6	1.6	1.33
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries	2.4	5.6	0.8	2.4	0	10.4	0.8	0	0	0	0	0	1.87
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.: Fr.) Link	1.6	0.8	0	4.0	0	0.8	0	0	0	0.8	7.2	11.2	2.20
<i>Colletotricum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.0	4.0	2.17
<i>C.truncatum</i> (Schwein.) Andrus & More	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptococcus</i> sp.	1.6	1.6	0	1.6	0.8	8.8	0	0.8	0	6.4	1.6	9.6	2.73
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijni	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6	0.13
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	0	0	0	0.8	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0.13
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0.07
<i>F. graminearum</i> Schwabe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. incarnatum</i> (Roberge) Sacc.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0.07
<i>F. oxysporum</i> Schlechtendal	0	0.8	0	0.8	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0.20
<i>F. poae</i> (Peck) Wollenw.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. &	0	0	0.8	0	0	0	0	0.8	0	0	1.6	0.8	0.33
<i>Leptosphaeria</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Myrothecium striatisporum</i> Preston	0	0	0	0	0	1.6	0	0	0	0	0	0	0.13
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0.8	0.13
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Penicillium</i> sp. 1	0.8	2.4	4.8	1.6	5.6	7.2	4.0	8.8	4.0	11.2	0.8	10.4	5.13
<i>Penicillium</i> sp. 2	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	2.4	0	0	0.27
<i>Phialophora gregata</i> (Allington & Chamb) Gams	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.8	1.6	6.4	0.80
<i>Phomopsis sojae</i> Lehman	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	1.6	3.2	0.47
<i>Pleospora herbarum</i> (Pers.) Rabenh.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula rubra</i> (Demme) Lodde	0.8	1.6	0	0	6.4	0.8	1.6	1.6	1.6	2.4	0	6.4	1.93
<i>Spegazzinia tessarthra</i> (Berk. & Curtis) Sacc.	0	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13

<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.	0.8	0	0	0	0	0	1.6	0	0	0.8	0	0	0.27
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai	0	22.4	0	0	0	0	2.4	6.4	0	0	0	0	2.60
<i>T. hamatum</i> (Bonord.) Bainier	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>T. harzianum</i> Rifai	0	0	0	0	0	8.8	0	2.4	0	0.8	0	0	1.00
<i>T. koningii</i> Oudem	0	0	11.2	16.0	3.2	0	0	0	0	0	0	0	2.53
<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	0.8	18.4	0	0	0	0	0	2.4	0	0	0	0	1.80
<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	0	0	0	0	3.2	0	0	0	0	0	0	0	0.27
Promedios													
	Año 1						Año 2						
	0.31	1.38	0.49	0.68	0.62	1.05	0.51	0.97	0.17	0.76	1.26	1.66	
Hojas	0.47						0.65						
Tallos	1.04						1.13						
Promedio de órganos	0.75						0.89						
Promedio de estadíos	V1: 0.84						V1: 0.74						0.79
			V5: 0.58						V5: 0.46				0.52
				V7: 0.83						V7: 1.46			1.14

LSD estadíos: 0.26; LSD órganos: 0.21; LSD endófitos: 0.95; LSD años × endófitos: 1.34; LSD estadíos × endófitos: 1.64; LSD órganos × endófitos: 1.34; LSD años × estadíos × endófitos: 2.33; LSD años × órganos × endófitos: 1.90; LSD estadíos × órganos × endófitos: 2.33; LSD años × estadíos × órganos × endófitos: 3.29.

En la Figura 16 puede observarse que hubo diferencias cuali-cuantitativas en las especies endófitas aisladas de los órganos de soja en el estado vegetativo en ambos años evaluados. Algunas especies solo fueron aisladas en el primer año como *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2, *E. nigrum*, *M. striatisporum*, *P. lilacium*, *S. tessarthra*, *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* y otras solo en el segundo año como *Arthriniuim* sp., *Aspergillus* sp. 4, *C. gloeosporioides*, *D. phaseolorum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *Penicillium* sp. 2, *P. gregata* y *Phomopsis* sp. Otros endófitos se presentaron en ambos años pero con una marcada abundancia en el segundo año, como *A. alternata*, *Aspergillus niger*, *B. sorokiniana*, *Penicillium* sp. 1 mientras que *C. herbarum*, *Cryptococcus* sp., *G. cingulata*, *R. rubra* y *S. botryosum* solo con aumentos leves hacia el segundo año y las cuales estarían respondiendo al efecto de las condiciones ambientales más húmedas de ese año con respecto al primero. Por el contrario, especies como *C. globosum*, *F. oxysporum*, *T. aureoviride*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* se presentaron con mayor abundancia en el primer año, sin embargo, *N. sphaerica* mantuvo similares valores para ambos años.

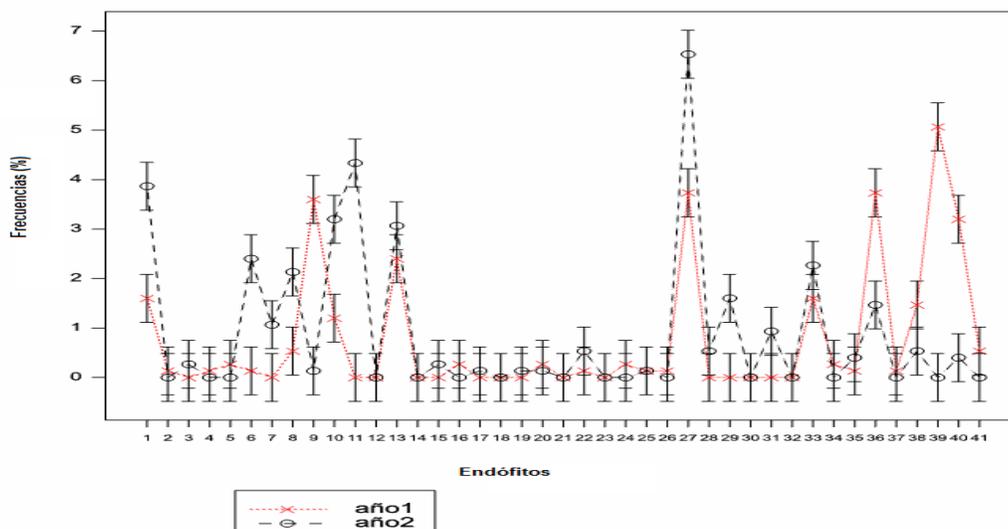


Figura 16. Interacción endófitos × años en estados vegetativos de la soja.

***Endófitos:** 1: *Alternaria alternata*; 2: *Alternaria* sp.; 3: *Arthriniuim* sp.; 4: *Aspergillus* sp.1; 5: *Aspergillus* sp. 2; 6: *Aspergillus niger*; 7: *Aspergillus* sp. 4; 8: *Bipolaris sorokiniana*; 9: *Chaetomium globosum*; 10: *Cladosporium herbarum*; 11: *Colletotrichum gloeosporioides*; 12: *C. truncatum*; 13: *Cryptococcus* sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Diaporthe phaseolorum*; 16: *Epicocum nigrum*; 17: *Fusarium equiseti*; 18: *F. graminearum*; 19: *F. incarnatum*; 20: *F. oxysporum*; 21: *F. poae*; 22: *Glomerella cingulata*; 23: *Leptosphaeria* sp.; 24: *Myrothecium striatisporum*; 25: *Nigrospora sphaerica*; 26: *Paecilomyces lilacinum*; 27: *Penicillium* sp. 1; 28: *Penicillium* sp. 2; 29: *Phialophora gregata*; 30: *Phomopsis sojae*; 31: *Phomopsis* sp.; 32: *Pleospora herbarum*; 33: *Rhodotorula rubra*; 34: *Segazzinia tessarthra*; 35: *Stemphyllium botryosum*; 36: *Trichoderma aureoviride*; 37: *T. hamatum*; 38: *T. harzianum*; 39: *T. koningii*; 40: *T. longibrachiatum*; 41: *T. pseudokoningii*.

En la Figura 17 se muestran las variaciones cuali-cuantitativas de los endófitos aislados de los estadios vegetativos en ambos años. Algunas especies como *Alternaria* sp., *C. gloeosporioides*, *D. phaseolorum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *M. striatisporium*, *N. sphaerica*, *T. hamatum* y *T. pseudokoningii* estuvieron solo presentes en el estadio V7, mientras que *T. aureoviride*, *T. longibrachiatum*, *S. tessarthra* y *Aspergillus* sp. 1 solo en el estadio V1. Otras variaciones fueron encontradas con especies que mostraron un incremento en algunos casos más marcados que otros de V1 a V7 como *A. alternata*, *C. herbarum*, *Cryptococcus* sp. (en particular en el segundo año), *G. cingulata*, *Penicillium* sp. 1, *P. gregata* (en el segundo año), *Phomopsis* sp. y *R. rubra*. Por el contrario, *A. niger*, *Aspergillus* sp. 4 fueron en disminución en los estadios vegetativos.

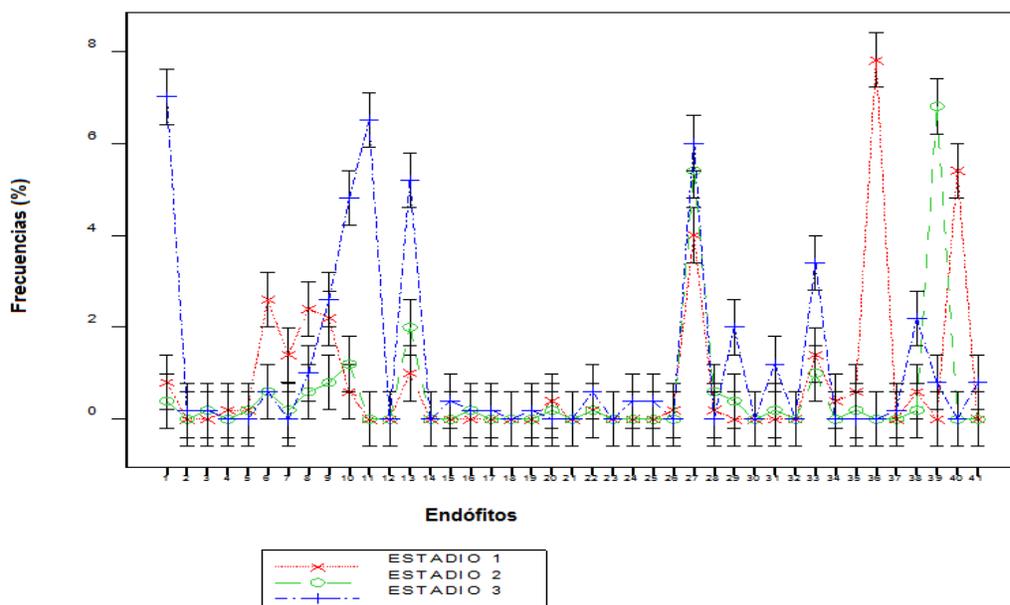


Figura 17. Interacción endófitos × estadios vegetativos de la soja.

***Endófitos:** 1: *Alternaria alternata*; 2: *Alternaria* sp.; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Aspergillus* sp.1; 5: *Aspergillus* sp. 2; 6: *Aspergillus niger*; 7: *Aspergillus* sp. 4; 8: *Bipolaris sorokiniana*; 9: *Chaetomium globosum*; 10: *Cladosporium herbarum*; 11: *Colletotrichum gloeosporioides*; 12: *C. truncatum*; 13: *Cryptococcus* sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Diaporthe phaseolorum*; 16: *Epicocum nigrum*; 17: *Fusarium equiseti*; 18: *F. graminearum*; 19: *F. incarnatum*; 20: *F. oxysporum*; 21: *F. poae*; 22: *Glomerella cingulata*; 23: *Leptosphaeria* sp.; 24: *Myrothecium striatisporium*; 25: *Nigrospora sphaerica*; 26: *Paecilomyces lilacinum*; 27: *Penicillium* sp. 1; 28: *Penicillium* sp. 2; 29: *Phialophora gregata*; 30: *Phomopsis sojae*; 31: *Phomopsis* sp.; 32: *Pleospora herbarum*; 33: *Rhodotorula rubra*; 34: *Segazzinia tessarthra*; 35: *Stemphyllium botryosum*; 36: *Trichoderma aureoviride*; 37: *T. hamatum*; 38: *T. harzianum*; 39: *T. koningii*; 40: *T. longibrachiatum*; 41: *T. pseudokoningii*.

La significancia órganos x endófitos se explica porque hubo diferencias cuali-cuantitativas en los endófitos aislados de los órganos en el estado vegetativo (Figura 18). Algunas especies sólo fueron registradas en las hojas como *Aspergillus* sp. 1, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *P. lilacinum*, *T. hamatum* y *T. pseudokoningii* mientras que otras especies solo se aislaron de los tallos como *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp., *Aspergillus* sp. 4, *D. phaseolorum*, *E. nigrum*, *F. oxysporum*, *M. striatisporum*, *N. sphaerica*, *S. tessartha* y *T. harzianum*. El resto de las especies fueron encontradas en ambos órganos si bien algunas se presentaron con frecuencias levemente mayores en tallos como *C. herbarum*, *Cryptococcus* sp. y *Penicillium* sp.1 y *C. globosum*, o en hojas como *A. alternata* y *C. gloeosporioides*.

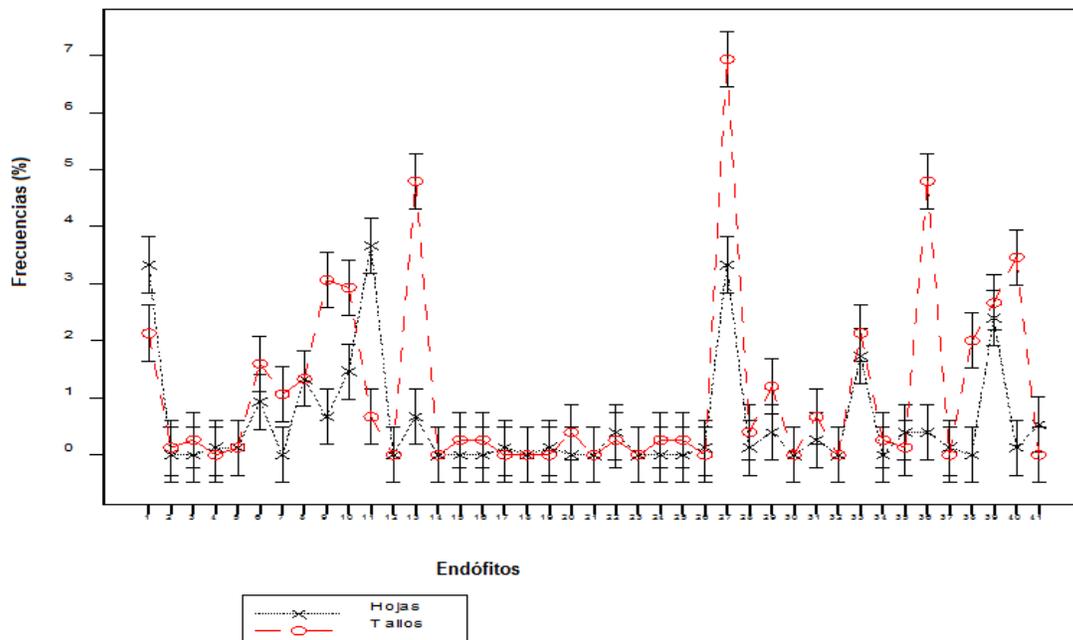


Figura 18. Interacción endófitos × órganos en estadios vegetativos de la soja.

*Endófitos: 1: *Alternaria alternata*; 2: *Alternaria* sp.; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Aspergillus* sp.1; 5: *Aspergillus* sp. 2; 6: *Aspergillus niger*; 7: *Aspergillus* sp. 4; 8: *Bipolaris sorokiniana*; 9: *Chaetomium globosum*; 10: *Cladosporium herbarum*; 11: *Colletotrichum gloeosporioides*; 12: *C. truncatum*; 13: *Cryptococcus* sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Diaporthe phaseolorum*; 16: *Epicocum nigrum*; 17: *Fusarium equiseti*; 18: *F. graminearum*; 19: *F. incarnatum*; 20: *F. oxysporum*; 21: *F. poae*; 22: *Glomerella cingulata*; 23: *Leptosphaeria* sp.; 24: *Myrothecium striatisporum*; 25: *Nigrospora sphaerica*; 26: *Paecilomyces lilacinum*; 27: *Penicillium* sp. 1; 28: *Penicillium* sp. 2; 29: *Phialophora gregata*; 30: *Phomopsis sojae*; 31: *Phomopsis* sp.; 32: *Pleospora herbarum*; 33: *Rhodotorula rubra*; 34: *Segazzinia tessartha*; 35: *Stemphyllium botryosum*; 36: *Trichoderma aureoviride*; 37: *T. hamatum*; 38: *T. harzianum*; 39: *T. koningii*; 40: *T. longibrachiatum*; 41: *T. pseudokoningii*.

Las interacciones triples años × estadios × endófitos, años × órganos × endófitos y estadios × órganos × endófitos resultan en la significancia de la interacción cuádruple años × estadios × órganos × endófitos, indicando diferentes frecuencias de los endófitos dependiendo del año, de los órganos y del estadio fenológico. Así, las frecuencias más altas de endófitos fueron registradas en el estadio V7 y las menores en V5; más endófitos se encontraron en tallos que en hojas; algunos pocos endófitos estuvieron presentes con altas frecuencias como *Penicillium* sp.1, *Cryptococcus* sp., *A. alternata*, *T. aureoviride*, *T. koningii*, *C. herbarum* y *C. gloeosporioides*. Cabe aclarar aquí que algunos endófitos no estuvieron presentes en el estado vegetativo como *C. truncatum*, *C. lunata*, *F. graminearum*, *F. poae*, *Leptosphaeria* sp., *P. sojae* y *P. herbarum* (se presentan en la Tabla con valor 0).

En la Tabla 12 se muestran las medias de las frecuencias de los endófitos aislados de hojas, tallos y vainas en los estados R4 y R6 en dos campañas agrícolas diferentes. Como puede verse, se aislaron 30 especies de estos tejidos presentando las mayores frecuencias *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *G. cingulata*, *P. gregata* y *Phomopsis* sp.

Tabla 12. Medias de las frecuencias de los endófitos aislados de tres órganos de la soja en dos estadios reproductivos en dos campañas agrícolas

Endófitos	Año 1						Año 2						Promedio
	R4			R6			R4			R6			
	Hoja	Tallos	Vainas	Hoja	Tallos	Vainas	Hoja	Tallos	Vainas	Hoja	Tallos	Vainas	
<i>Alternaria alternata</i>	6.4	1.6	0	40.8	0.8	17.6	15.2	6.4	0	31.2	10.4	3.2	11.13
<i>Alternaria</i> sp.	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Arthrinium</i> sp.	0	0	0	0	0	0.8	0	1.6	0	0	0	0	0.20
<i>Aspergillus</i> sp.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.07
<i>Aspergillus</i> sp. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0	0	0	0	0	0	0.8	0.8	0.8	0	0	0.8	0.27
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	4.0	0.8	0	0	0	0.8	0	0	0.8	0	0.53
<i>Cladosporium herbarum</i>	2.4	1.6	0	0.8	8.8	1.6	0.8	3.2	0	0	0	2.4	1.80
<i>Colletotricum gloeosporioides</i>	0	0	0	0	0	0	8	1.6	17.6	77.6	30.4	37.6	14.4
<i>C. truncatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.8	1.6	0.27
<i>Cryptococcus</i> sp.	0	9.6	0	0.8	4.0	4.8	0.8	0	0	0	0	0	1.67
<i>Curvularia lunata</i>	0.8	0	0	0	0	0	0.8	0.8	0	0	0.8	0	0.27
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	0	0	0	0	10.4	0	0	0	0	2.4	0	1.07
<i>Fusarium equiseti</i>	0	0	0	0	0	0	0	1.6	0	0	0	0	0.13
<i>F. graminearum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	5.6	3.2	0.80
<i>F. incarnatum</i>	0	0	0	0	0	0	0.8	1.6	0	0	0	0	0.20
<i>F. oxysporum</i>	0.8	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0.20
<i>F. poae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0.07
<i>Glomerella cingulata</i>	0	0	0	0	0	0	1.6	3.2	0	11.2	31.2	28.8	6.33
<i>Leptosphaeria</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0.07
<i>Myrothecium striatisporum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0.8	4.0	0	0	0	0	0	2.4	0	0	1.6	0	0.73
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Penicillium</i> sp. 1	0	0	2.4	0	0	0	3.2	5.6	1.6	0	0	0	1.07
<i>Penicillium</i> sp. 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phialophora gregata</i>	0	0	0	0	0	0.8	3.2	32.8	15.2	0	6.4	2.4	5.07

<i>Phomopsis sojae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	28.0	15.2	3.67
<i>Pleospora herbarum</i>	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0.07
<i>Rhodotorula rubra</i>	0.8	0.8	0	0.8	4.8	0.8	0	0	0.8	0	0	0	0.73
<i>Spegazzinia tessartha</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stemphylium botryosum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma aureoviride</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. hamatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.8	0	0	4.0	0.47
<i>T. koningii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.8	4.0	1.6	0.53
<i>T. pseudokoningii</i>	0	0	0	0	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0.13
Promedios													
Año 1	0.33	0.43	0.20	1.07	0.49	0.92	Año 2	0.88	1.60	0.90	2.97	3.00	2.48
Hojas	0.70							1.92					1.31
Tallos	0.46							2.30					1.38
Vainas	0.56							1.69					1.12
Promedio órganos	0.57							1.97					1.27
Promedio estadíos		R4: 0.32						R4: 1.13					0.72
						R6: 0.83						R6: 2.82	1.82

LSD años: 0.24; LSD estadíos: 0.24; LSD órganos: 0.30; LSD endófitos: 1.10; LSD años × estadíos: 0.34; LSD años × órganos: 0.42; LSD estadíos × órganos: 0.42; LSD años × endófitos: 1.55; LSD estadíos × endófitos: 1.55; LSD órganos × endófitos: 1.90; LSD años × estadíos × órganos: 0.59; LSD años × estadíos × endófitos: 2.20; LSD años × órganos × endófitos: 2.69; LSD estadíos × órganos × endófitos: 2.69; LSD años × estadíos × órganos × endófitos: 3.80.

La interacción endófitos x años se debió a que si bien en el estado reproductivo algunas especies como *A. alternata*, *Arthrimum* sp. y *F. oxysporum* fueron aisladas con valores similares en ambos años, otras especies se registraron con frecuencias mayores en el primer año como *C. herbarum*, *C. globosum*, *Cryptococcus* sp., *E. nigrum*, *N. sphaerica* y *Rhodotorula rubra*, mientras que *P. gregata* con mayores valores en el segundo año. *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. 2, *P. lilacinum*, *P. herbarum* y *T. pseudokoningii* fueron aisladas solo en el primer año y, *A. niger*, *B. sorokiniana*, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. poae*, *G. cingulata*, *Leptosphaeria* sp., *Phomopsis* sp., *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* solo fueron aisladas en el segundo año (Figura 19).

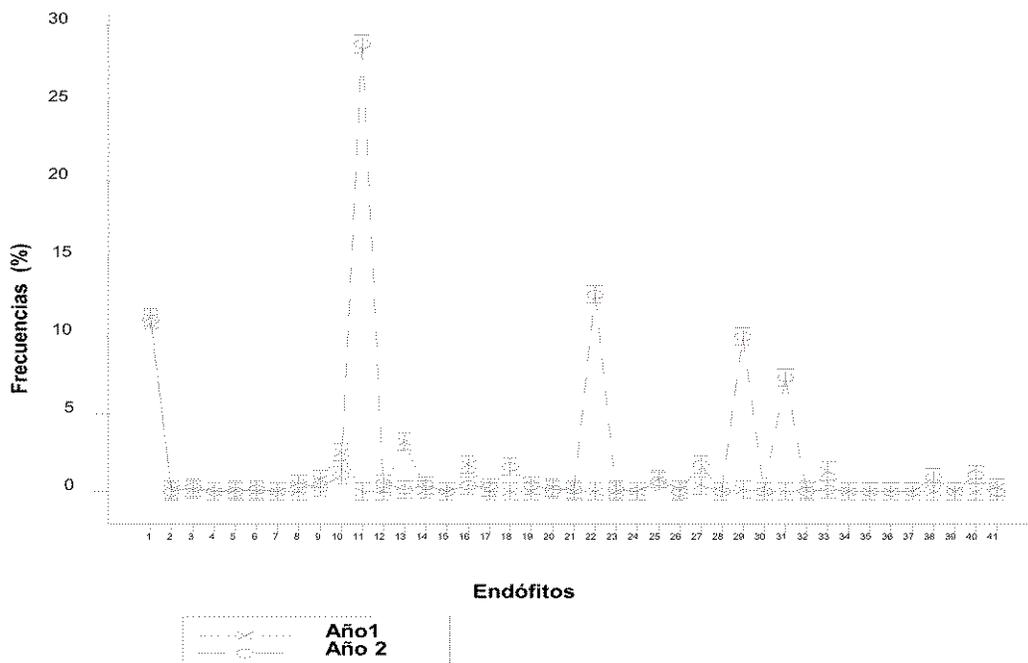


Figura 19. Interacción endófitos x años en el estado reproductivos de la soja.

***Endófitos:** 1: *Alternaria alternata*; 2: *Alternaria* sp.; 3: *Arthrimum* sp.; 4: *Aspergillus* sp.1; 5: *Aspergillus* sp. 2; 6: *Aspergillus niger*; 7: *Aspergillus* sp. 4; 8: *Bipolaris sorokiniana*; 9: *Chaetomium globosum*; 10: *Cladosporium herbarum*; 11: *Colletotrichum gloeosporioides*; 12: *C. truncatum*; 13: *Cryptococcus* sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Diaporthe phaseolorum*; 16: *Epicocum nigrum*; 17: *Fusarium equiseti*; 18: *F. graminearum*; 19: *F. incarnatum*; 20: *F. oxysporum*; 21: *F. poae*; 22: *Glomerella cingulata*; 23: *Leptosphaeria* sp.; 24: *Myrothecium striatisporum*; 25: *Nigrospora sphaerica*; 26: *Paecilomyces lilacinum*; 27: *Penicillium* sp. 1; 28: *Penicillium* sp. 2; 29: *Phialophora gregata*; 30: *Phomopsis sojae*; 31: *Phomopsis* sp.; 32: *Pleospora herbarum*; 33: *Rhodotorula rubra*; 34: *Segazzinia tessartha*; 35: *Stemphyllium botryosum*; 36: *Trichoderma aureoviride*; 37: *T. hamatum*; 38: *T. harzianum*; 39: *T. koningii*; 40: *T. longibrachiatum*; 41: *T. pseudokoningii*.

La significancia de la interacción estadíos x endófitos se debió a que si bien la mayoría de los endófitos fueron aislados en ambos estadíos reproductivos evaluados algunos como *A.*

alternata, *C. gloeosporioides*, *G. cingulata* y *Phomopsis* sp. incrementaron su frecuencia con el avance de los estadios reproductivos (R4 a R6) mientras que otras como *Penicillium* sp. 1 y *P. gregata* y *N. sphaerica* disminuyeron su frecuencia (Figura 20).

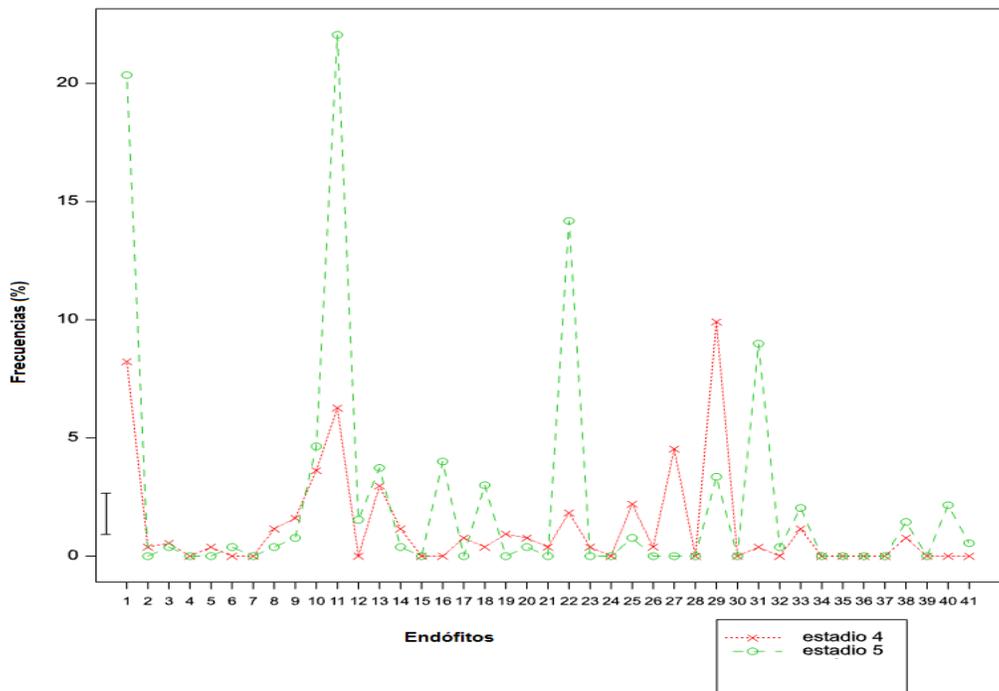


Figura 20. Interacción estadios × endófitos en el estado reproductivo.

*Endófitos: **1:** *Alternaria alternata*; **2:** *Alternaria* sp.; **3:** *Arthrinium* sp.; **4:** *Aspergillus* sp.1; **5:** *Aspergillus* sp. 2; **6:** *Aspergillus niger*; **7:** *Aspergillus* sp. 4; **8:** *Bipolaris sorokiniana*; **9:** *Chaetomium globosum*; **10:** *Cladosporium herbarum*; **11:** *Colletotrichum gloeosporioides*; **12:** *C. truncatum*; **13:** *Cryptococcus* sp.; **14:** *Curvularia lunata*; **15:** *Diaporthe phaseolorum*; **16:** *Epicocum nigrum*; **17:** *Fusarium equiseti*; **18:** *F. graminearum*; **19:** *F. incarnatum*; **20:** *F. oxysporum*; **21:** *F. poae*; **22:** *Glomerella cingulata*; **23:** *Leptosphaeria* sp.; **24:** *Myrothecium striatisporum*; **25:** *Nigrospora sphaerica*; **26:** *Paecilomyces lilacinum*; **27:** *Penicillium* sp. 1; **28:** *Penicillium* sp. 2; **29:** *Phialophora gregata*; **30:** *Phomopsis sojae*; **31:** *Phomopsis* sp.; **32:** *Pleospora herbarum*; **33:** *Rhodotorula rubra*; **34:** *Segazzinia tessartha*; **35:** *Stemphyllium botryosum*; **36:** *Trichoderma aureoviride*; **37:** *T. hamatum*; **38:** *T. harzianum*; **39:** *T. koningii*; **40:** *T. longibrachiatum*; **41:** *T. pseudokoningii*.

La interacción endófitos × órganos fue significativa porque algunos endófitos fueron aislados solo de hojas (*Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. 2), solo de tallos (*F. equiseti*, *F. poae* y *T. pseudokoningii*), solo de vainas (*A. niger*, *P. lilacinum* y *P. herbarum*), de tallos y de vainas (*Arthrinium* sp., *E. nigrum*, *F. graminearum*, *Phomopsis* sp. y *T. harzianum*), de hojas y tallos (*C. lunata*, *F. incarnatum* y *N. sphaerica*) y otros de los 3 órganos (*A. alternata*, *C. herbarum*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *G. cingulata* y *R. rubra*). Entre los que se aislaron de hojas, tallos

y vainas algunos presentaron mayores frecuencias en hoja (*A. alternata* y *C. gloeosporioides*), otros en tallo (*C. herbarum*, *G. cingulata*, *R. rubra* y *T. longibrachiatum*) mientras que *C. globosum* en vainas (Figura 21).

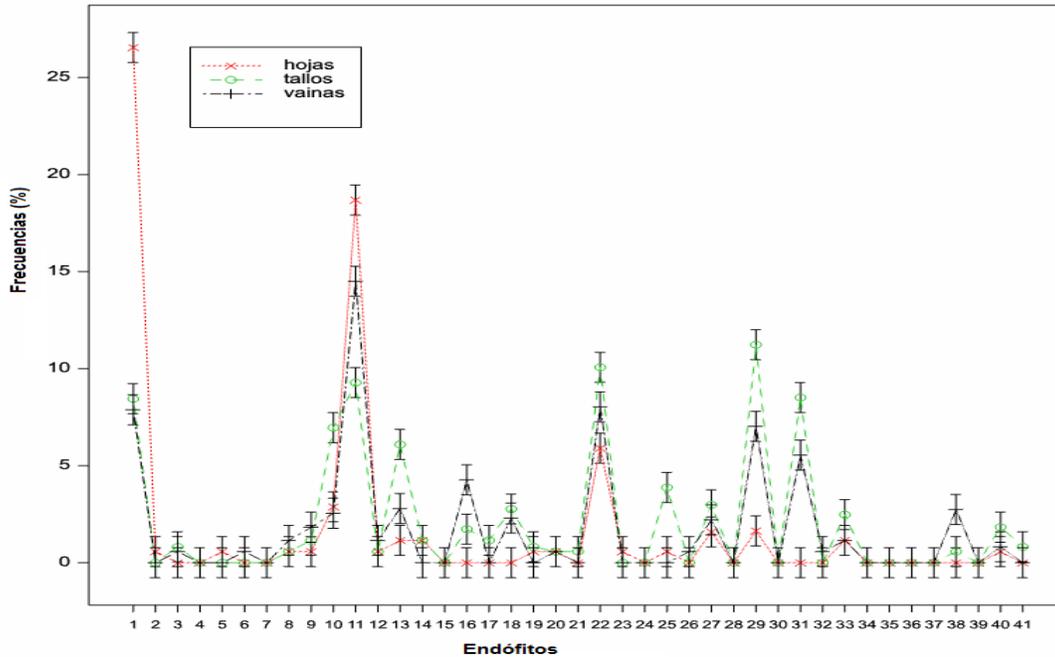


Figura 21. Interacción órganos × endófitos.

***Endófitos:** 1: *Alternaria alternata*; 2: *Alternaria* sp.; 3: *Arthrinium* sp.; 4: *Aspergillus* sp.1; 5: *Aspergillus* sp. 2; 6: *Aspergillus niger*; 7: *Aspergillus* sp. 4; 8: *Bipolaris sorokiniana*; 9: *Chaetomium globosum*; 10: *Cladosporium herbarum*; 11: *Colletotrichum gloeosporioides*; 12: *C. truncatum*; 13: *Cryptococcus* sp.; 14: *Curvularia lunata*; 15: *Diaporthe phaseolorum*; 16: *Epicocum nigrum*; 17: *Fusarium equiseti*; 18: *F. graminearum*; 19: *F. incarnatum*; 20: *F. oxysporum*; 21: *F. poae*; 22: *Glomerella cingulata*; 23: *Leptosphaeria* sp.; 24: *Myrothecium striatisporum*; 25: *Nigrospora sphaerica*; 26: *Paecilomyces lilacinum*; 27: *Penicillium* sp. 1; 28: *Penicillium* sp. 2; 29: *Phialophora gregata*; 30: *Phomopsis sojae*; 31: *Phomopsis* sp.; 32: *Pleospora herbarum*; 33: *Rhodotorula rubra*; 34: *Segazzinia tessarhtra*; 35: *Stemphyllium botryosum*; 36: *Trichoderma aureoviride*; 37: *T. hamatum*; 38: *T. harzianum*; 39: *T. koningii*; 40: *T. longibrachiatum*; 41: *T. pseudokoningii*.

Las interacciones triples años × estadíos × endófitos, años × órganos × endófitos y estadíos × órganos × endófitos resultaron en la interacción cuádruple significativa. Ello es debido a que hubo variaciones de las frecuencias de los endófitos aislados en el estado reproductivo según el año, estadío y órgano.

En síntesis, para ambos estados, los resultados de ambos años muestran que las especies endófitas más frecuentemente aisladas en los estadíos vegetativos de la soja fueron *Penicillium* sp. 1, *A. alternata*, *Cryptococcus* sp., *T. aureoviride*, *T. koningii*, *C. herbarum*, *C.*

gloeosporioides, *R. rubra* y *T. longibrachiatum* y para los estadios reproductivos fueron *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *G. cingulata*, *P. gregata*, *Phomopsis* sp. y *C. herbarum*.

Por lo tanto, algunas especies fueron aisladas en ambos años y en ambos estados (vegetativos y reproductivos) del ciclo fenológico de la soja como *A. alternata*, *C. herbarum*, *Cryptococcus* sp., *Penicillium* sp. 1 y *R. rubra*. A su vez, algunas de ellas como *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *G. cingulata*, *P. gregata*, *Phomopsis* sp. aumentaron marcadamente sus frecuencias a lo largo del ciclo del cultivo mientras que otras no presentaron variación (ej. *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp 1) o una marcada variación (*E. nigrum*, *F. equiseti* y *F. incarnatum*) o fueron disminuyendo sus frecuencias, entre las que puede mencionarse a *Aspergillus niger*, *B. sorokiniana*, *C. globosum*, *C. herbarum* y *Cryptococcus* sp., entre otros.

Cabe destacar por un lado, que las especies endófitas del género *Trichoderma* fueron aisladas con mayores frecuencias en el estado vegetativo y, tal como puede verse en la Tabla 12, muchos de los endófitos aislados en el estado reproductivo en el segundo año corresponden a especies de conocidos patógenos de la soja lo cual a su vez ha coincidido con condiciones ambientales más húmedas durante el desarrollo del cultivo. Asimismo, puede mencionarse que 41 especies endófitas fueron aisladas en los dos años evaluados, destacándose por sus frecuencias en el primer año *A. alternata*, *Penicillium* sp. 1, *T. aureoviride*, *T. koningii*, *C. globosum*, *Cryptococcus* sp., *C. herbarum* y *R. rubra* mientras que en el segundo año las mayores frecuencias correspondieron a *C. gloeosporioides*, *G. cingulata*, *A. alternata*, *P. gregata*, *Phomopsis* sp. y *Penicillium* sp. 1.

A continuación se presentan los resultados del análisis de las frecuencias de los endófitos aislados en vainas de soja en el estadio R8 (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. ANAVA de los endófitos de vainas de soja en el estadio R8 en dos campañas agrícolas

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Años	1	0.17	0.002
Endófitos	40	0.86	≤0.001
Años × endófitos	40	0.82	P≤0.001
Error	1944	0.18	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Tabla 14. Medias de los endófitos de vainas de soja en el estadio R8 en dos campañas agrícolas

Endófitos de vainas	Año 1	Año 2	Media
<i>Alternaria alternata</i>	84.80 a*	4.80 e	44.80 a
<i>Alternaria</i> sp.	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Arthrinium</i> sp.	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Aspergillus</i> sp.1	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Aspergillus niger</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Aspergillus</i> sp. 4	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Chaetomium globosum</i>	0.80 c	0.00 b	0.40 f
<i>Cladosporium herbarum</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2.40 c	36.80 b	19.60 c
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0.00 c	20.00 c	10.0 e
<i>Cryptococcus</i> sp.	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Curvularia lunata</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	0.80 c	0.00 b	0.40 f
<i>Epicoccum nigrum</i>	9.60 b	0.00 b	4.80 d
<i>Fusarium equiseti</i>	0.00 c	12.80 d	6.40 de
<i>F. graminearum</i>	0.00 c	54.40 a	27.20 b
<i>F. incarnatum</i>	0.00 c	12.80 d	6.40 de
<i>F. oxysporum</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>F. poae</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Glomerella cingulata</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Leptosphaeria</i> sp.	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Myrothecium striatisporum</i>	0.80 c	0.00 f	0.40 f
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Penicillium</i> sp. 1	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Penicillium</i> sp. 2	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Phialophora gregata</i>	0.00 c	2.40 e	1.20 f
<i>Phomopsis sojae</i>	1.60 c	0.00 f	0.80 f
<i>Phomopsis</i> sp.	0.00 c	4.00 e	2.00 f
<i>Pleospora herbarum</i> (Fr.) Raben.	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Rhodotorula rubra</i> Harrison	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Spegazzinia tessarthra</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Stemphylium botryosum</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>Trichoderma aureoviride</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>T. hamatum</i>	0.00 c	1.60 e	0.80 f
<i>T. harzianum</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>T. koningii</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>T. longibrachiatum</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
<i>T. pseudokoningii</i>	0.00 c	0.00 f	0.00 f
Promedios	2.46**	3.65	

*Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no difieren estadísticamente. Test de F ($P \leq 0.05$); * LSD años: 0.01151.

Como puede verse en la Tabla 13, hubo diferencias significativas entre los años, los endófitos y en la interacción años × endófitos. Los endófitos más frecuentemente aislados de semillas de soja fueron *A. alternata*, *F. graminearum*, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum* y *F. equiseti*. La interacción años × endófito fue significativa debido a que hubo diferencias entre los dos años de la presencia de algunos endófitos. Por ejemplo, *A. alternata* presentó mayores frecuencias en el primer año que en el segundo, por el contrario, *C. gloeosporioides* fue mayor en el segundo que el primero. A su vez, algunos endófitos solo fueron aislados en el primer año como *C. globosum*, *D. phaseolorum*, *E. nigrum*, *Myrothecium* sp. y *P. sojae*, mientras que *C. truncatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *P. gregata* y *T. hamatum* solo se aislaron en el segundo año (Tabla 14).

2.4.2. Micobiota endofítica de las semillas de soja

Del total de semillas analizadas (100 por cada año) se obtuvieron 118 aislamientos en el primer año mientras que para el segundo año correspondieron a 73. Los resultados del ANAVA de los endófitos aislados de las semillas mostraron que hubo diferencias significativas entre los años, los endófitos y en la interacción años × endófitos (Tabla 15). Las medias obtenidas se indican en la Tabla 16.

Tabla 15. ANAVA para la frecuencia de endófitos de semillas de soja

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Repeticiones	3	0.000	
Años	1	0.002	0.004
Endófitos	13	0.007	≤0.001
Años x endófitos	13	0.007	≤0.001
Error	529	0.327	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Tabla 16. Medias de la frecuencia de la micobiota endofítica de semillas de soja cosechadas en dos campañas agrícolas

Endófitos	Año 1	Año 2	Medias
<i>Alternaria alternata</i>	79 a	2 e	40.5 a*
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	2 e	0 g	1.0 d
<i>Cladosporium herbarum</i>	0 f	1 f	0.5 d
<i>Chaetomium globosum</i>	0 f	1 f	0.5 d
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0 f	2 e	1.0 d
<i>Nigrospora sphaerica</i>	2 e	0 g	1.0 d
<i>Fusarium equiseti</i>	2 e	5 d	3.5 cd
<i>F. graminearum</i>	0 f	35 a	17.5 b
<i>F. incarnatum</i>	17 b	12 b	14.5 b
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	0 f	5 d	2.5 cd
<i>Phomopsis longicolla</i> Hobbs	5 d	1 f	3.0 cd
<i>P. sojae</i>	6 c	6 c	6.0 c
<i>Phomopsis</i> sp.	6 c	0 g	3.0 cd
<i>Trichoderma harzianum</i>	0 f	2 e	1.0 d
Promedio	8.50 a	5.14 b	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo al Test de F ($P \leq 0.05$).

A. alternata fue marcadamente el endófito que presentó las mayores frecuencias en las semillas de soja seguido por *F. graminearum* y *F. incarnatum*. Otras especies que puede destacarse por sus frecuencias son *F. equiseti*, *P. longicolla*, *Phomopsis* sp. y *F. sambucinum*.

La significancia de la interacción años \times endófitos fue ocasionada por la diferencia de las frecuencias de algunas especies como *A. alternata* que fue mayor en el primer año mientras que en el segundo las mayores frecuencias correspondieron a *F. graminearum*. Ciertas especies estuvieron presentes en los dos años como *A. alternata*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *P. longicolla* y *P. sojae*, otras solo en el primer año, como *B. sorokiniana* y *N. sphaerica* mientras que otras solo fueron aisladas en el segundo año, como *C. globosum*, *C. herbarum*, *C. truncatum*, *F. graminearum*, *F. sambucinum* y *T. harzianum*.

Las condiciones ambientales en los años en que se realizaron los ensayos fueron muy diferentes con respecto a los valores de humedad y precipitaciones, mientras que las medias de las temperaturas para ambos años no presentaron una importante variación. Tal como puede

verse en a continuación en la Tabla 17 las precipitaciones y el porcentaje de humedad ambiente fueron mayores durante el segundo año del ensayo.

Tabla 17. Datos climáticos registrados durante los ensayos de soja

Mes	Año 1 (campaña 2011-2012)		
	Temperatura (°C)	media	Humedad (%)
Diciembre	20.4		68.0
Enero	25.5		63.0
Febrero	24.7		80.0
Marzo	19.5		76.0
Abril	15.5		74.0
Mayo	15.0		82.0
Media del período	20.1		73.8
Total			285.2
	Año 2 (campaña 2012-2013)		
Diciembre	22.6		84.0
Enero	22.8		75.0
Febrero	22.0		83.0
Marzo	17.5		81.0
Abril	16.6		85.0
Mayo	12.9		88.0
Media del período	19.01		82.66
Total			824.1

Registros meteorológicos de la EEJH, Los Hornos, FCAy F, UNLP. Lat. 34°59' S-Long. 57°59' O de G. 45 msnm.

En síntesis, diversas especies endófitas fueron aisladas de plantas de soja observándose variaciones cuali-cuantitativas en los distintos años, estadios y órganos. La mayoría de las especies aisladas perteneció al Phylum Ascomycota distribuidos principalmente dentro de la clase Sordariomycetes y en menores proporciones a las clases Dothidiomycetes, Eurotiomycetes y Leotiomycetes.

3. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD ENDOFÍTICA DEL TRIGO Y DE LA SOJA

3.1. Diversidad endofítica

La agroecología estudia el agroecosistema como un todo (holísticamente) y por lo tanto es considerado un sistema complejo en el cual sus propiedades no solo dependen de sus componentes sino también de la interacción de los mismos.

En un agroecosistema, las plantas son organismos que conforman comunidades, definidas éstas, como el conjunto de poblaciones de distintas especies que se presentan juntas en el espacio y en el tiempo. En estas comunidades, las especies interactúan entre sí en diferentes procesos como mutualismo, parasitismo, depredación y competencia (Odum, 1974). El estudio de las comunidades y las interacciones de sus componentes provee nuevos conocimientos acerca del rol de los microbiomas de las plantas en la adaptación, evolución y respuesta al cambio climático (Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

Para los fitopatólogos cada planta es considerada una comunidad compleja dado que cada una de ellas es colonizada externa e internamente por una microbiota diversa. Los microorganismos endófitos constituyen solo una parte de esta comunidad, siendo componentes importantes de los microbiomas de las plantas, en las que interactúan entre ellos, con el hospedante y con otros organismos que colonizan los tejidos de las plantas, tales como los microorganismos saprófitos, epífitos, patógenos y las micorrizas (Porras Alfaro y Bayman, 2011). Debido a que una planta es colonizada por numerosos hongos endófitos, en particular por su mayoría, son consideradas un componente de importancia en la diversidad fúngica. En ecología la diversidad es un parámetro que describe la variedad de una comunidad y tiene diferentes dimensiones entre las cuales pueden mencionarse además del número de especies, la diversidad en la distribución espacial de los organismos en el sistema y la variación en el tiempo.

3.2. Objetivo

- Comparar la diversidad de las comunidades endófitas de trigo y soja.

3.3. Materiales y métodos

Con los resultados obtenidos de las frecuencias de los endófitos de los diferentes órganos, cultivares y estadíos del trigo y de los órganos y estadíos de soja se realizó un análisis de la diversidad aplicando los índices de Shannon-Wiener y de Simpson que determinan la riqueza y cantidad relativa de especies (abundancia). El valor de presencia de los endófitos correspondió al número de veces que un microorganismo fue aislado de los tejidos. Luego de la transformación de los datos, se calcularon la riqueza específica (S), como el número de especies aisladas en cada muestreo (órgano, cultivar y estadío), y los índices de diversidad utilizando el programa estadístico InfoStat (valor de confianza 0.95) (Di Rienzo *et al.*, 2012).

El índice de Shannon o índice de Shannon-Wiener es el más utilizado para medir la biodiversidad. Está representado normalmente como H' y se expresa con un número positivo, variando en la mayoría de los ecosistemas naturales entre 1 y 5. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una muestra de S (especies) y N individuos. La fórmula utilizada para su cálculo es la siguiente:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Donde: S es la riqueza específica y p_i es la proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos n_i/N (es decir la abundancia relativa de la especie i). Por lo tanto, un mayor valor de H' representa una comunidad que tenga una distribución de abundancias equitativa.

El índice de Simpson es también conocido como “el índice de dominancia” ya que el valor máximo 1 se obtiene cuando hay solamente una especie (dominancia completa) y, valores que se aproximan a 0 cuando hay numerosas especies (no existe dominancia). Su fórmula es: $D = \sum p_i^2$ y dado que es un índice de dominancia, para poder referirse en términos de diversidad se aplica $1 - D$, por lo cual la fórmula pasa a ser la siguiente:

$$D = 1 - \sum p_i^2$$

Donde: p_i : n_i/N , es la proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie i). Es la probabilidad de que dos ejemplares de la comunidad tomados al azar sean de la misma especie.

Para los estudios de comparación de diversidad suelen utilizarse dos índices y, en este estudio se seleccionaron el de Shannon-Wiener que considera riqueza y la uniformidad o equidad de las especies y el de Simpson que combina la riqueza con un grado de dominancia y la uniformidad.

Para la comparación de las comunidades endofíticas del trigo y de la soja preliminarmente se determinaron los índices con los datos de las frecuencias de los endófitos aislados de los 5 cultivares, 5 estadíos y 4 órganos de plantas de trigo y de 4 órganos, 6 estadíos y 2 años de un cultivar de soja. Luego, la comparación se realizó con los datos correspondientes a un cultivar de trigo (Buck Poncho) y de un año de soja (correspondiente al mismo año del ensayo) para el cálculo de la riqueza y los índices. Se realizó un análisis comparativo de las comunidades en los órganos de ambos hospedantes elaborándose los diagramas de Venn.

3.4. Resultados

A continuación se presentan los resultados del cálculo de la riqueza específica y de la aplicación de los índices de diversidad de los endófitos aislados en trigo y en soja.

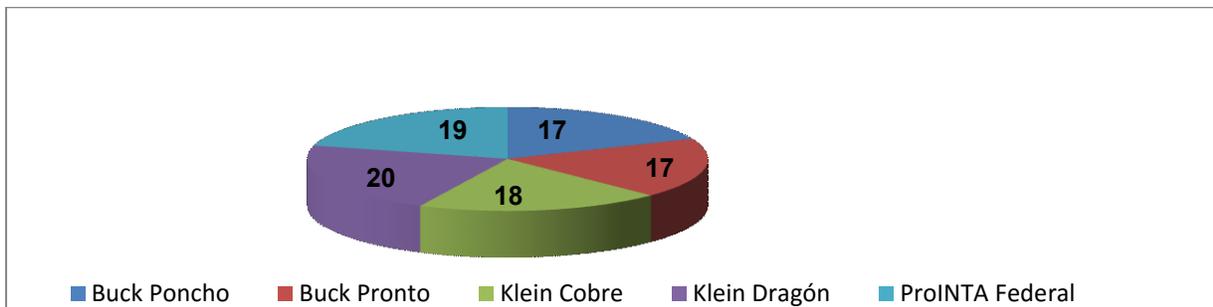


Figura 22. Riqueza específica de endófitos en cinco cultivares de trigo.

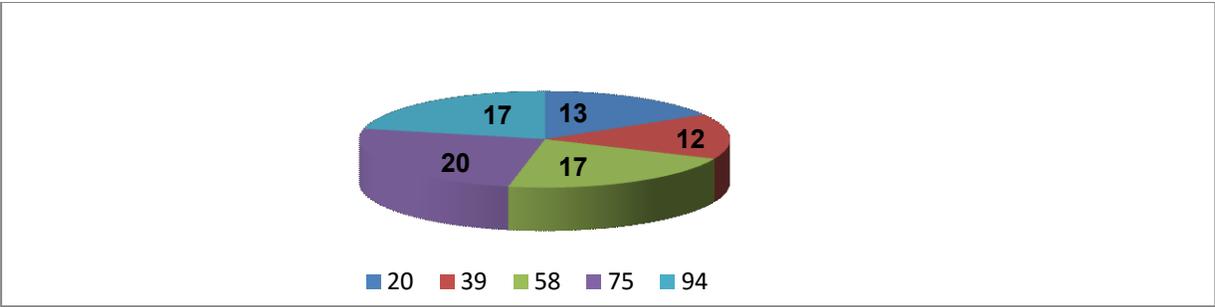


Figura 23. Riqueza específica de endófitos en cinco estadíos del trigo.

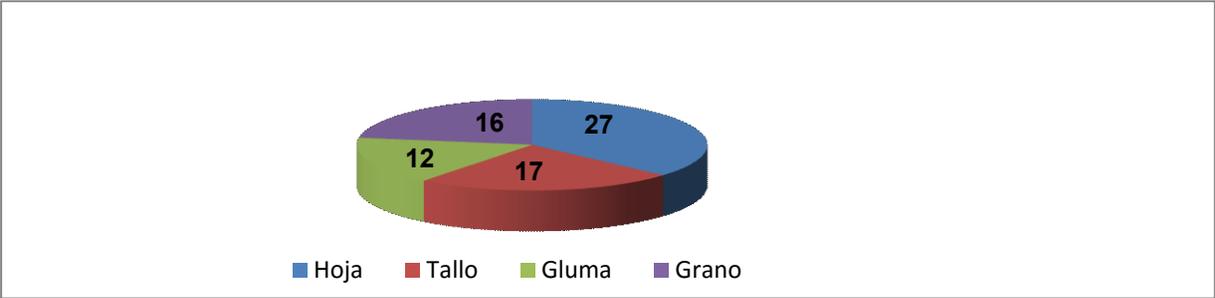


Figura 24. Riqueza específica de endófitos en cuatro órganos del trigo.

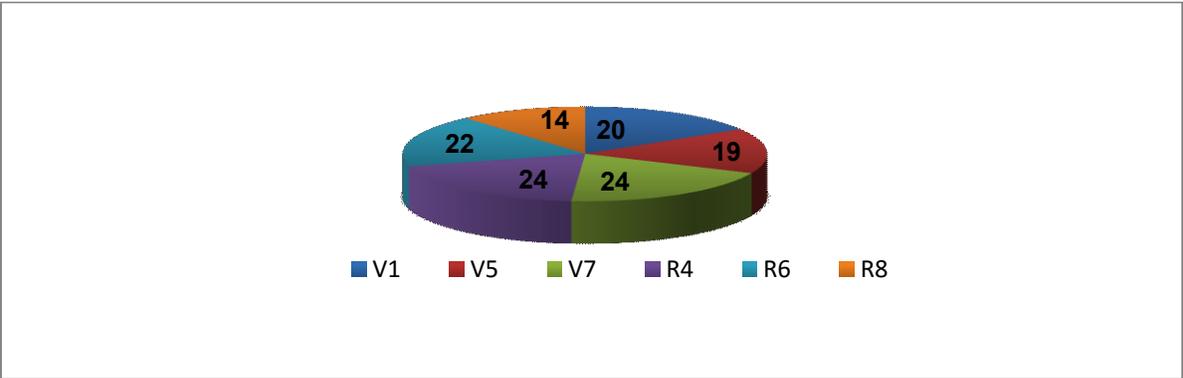


Figura 25. Riqueza específica de endófitos en seis estadíos de la soja.

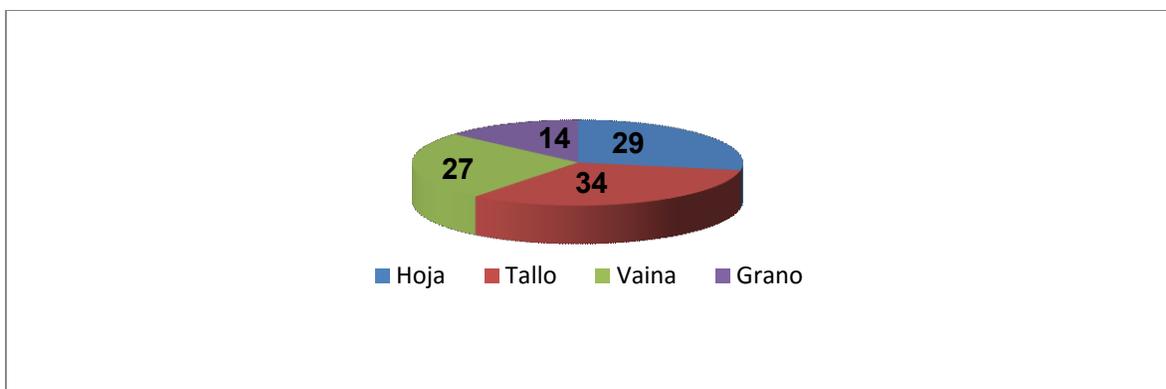


Figura 26. Riqueza específica de endófitos en cuatro órganos de la soja.

Como puede verse, los valores de la riqueza endofítica mostraron que en trigo no se observaron variaciones marcadas en los diferentes cultivares (tal como fuera demostrado en el análisis estadístico realizado en el ensayo con los 5 cultivares). Sin embargo, pueden observarse variaciones de la riqueza en los 5 estadios fenológicos analizados con una tendencia de aumento desde los estadios vegetativos hacia los reproductivos, y una disminución en el último estadio analizado. En los órganos del trigo la riqueza fue marcadamente mayor en las hojas con los menores valores para glumas.

En soja, los resultados del cálculo de la riqueza mostraron la misma tendencia que en trigo, presentando un aumento de la riqueza específica con el avance de los estadios y una disminución marcada en el último estadio. Los tallos fueron los órganos que presentaron los mayores valores de riqueza seguidos por las hojas.

Los resultados obtenidos de la aplicación de los índices de Shannon-Wiener y de Simpson mostraron una distribución medianamente equitativa de las especies endófitas en los estadios intermedios del trigo (58 y 75) y de la soja (V7 y R4), por el contrario, los valores denotan una marcada tendencia hacia la dominancia específica en el último estadio de soja (R8) (Tabla 18). Comparando los órganos, las hojas de trigo presentaron marcadamente una distribución más equitativa de especies endófitas que el resto de los órganos, mientras que en soja, el tallo y la vaina fueron los que presentaron una mejor distribución de las especies. Comparando los resultados de los índices para los granos de ambos hospedantes, puede observarse una diferencia con valores en soja que tienden a una mayor dominancia específica (Tabla 18).

Tabla 18. Índices de diversidad endofítica de cinco cultivares, cuatro órganos y cinco estadíos del trigo y de cuatro órganos, seis estadíos y dos años de un cultivar de soja

Variab les	Índice de Shannon- Wiener (H')*	Índice de Simpson**
TRIGO		
<i>Cultivares</i>		
Buck Poncho	2.44	0.10
Buck Pronto	2.44	0.10
Klein Cobre	2.53	0.09
Klein Dragón	2.58	0.09
ProINTA Federal	2.59	0.08
<i>Estadíos</i>		
20	2.11	0.16
39	2.14	0.14
58	2.39	0.10
75	2.60	0.08
94	2.15	0.16
<i>Organos</i>		
Hoja	2.87	0.06
Tallo	2.39	0.12
Gluma	2.03	0.16
Grano	2.09	0.16
SOJA		
Año 1	2.37	0.19
Año 2	2.57	0.12
<i>Estadíos</i>		
Vegetativos	2.91	0.07
Reproductivos	2.38	0.15
V1	2.44	0.12
V5	2.22	0.16
V7	2.61	0.09
R4	2.31	0.15
R6	2.00	0.20
R8	1.85	0.21
<i>Órganos</i>		
Hoja	2.07	0.22
Tallo	2.98	0.06
Vaina	2.33	0.14
Grano	1.81	0.24

*Valores entre 0 y 5. 0 indica dominancia y 5 distribución equitativa; ** Valores entre 0 y 1. 0= indica que no hay dominancia y 1 dominancia completa.

Si bien estos valores demuestran una distribución relativamente proporcional o equitativa de las especies endófitas en los tejidos de ambos hospedantes algunas especies fueron más frecuentemente encontradas que otras (abundancia relativa). Considerándose todos los órganos, en trigo las mayores frecuencias correspondieron a *Serratia* sp., *A. alternata*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Xanthomonas* sp., *Cryptococcus* sp., *R. rubra*, *Bacillus* sp., *Penicillium* sp. y *F. graminearum* mientras que en soja se destacaron en soja *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *G. cingulata*, *P. gregata*, *Penicillium* sp. 1, *F. graminearum*, *Phomopsis* sp., *Cryptococcus* sp. (Figuras 27 y 28).

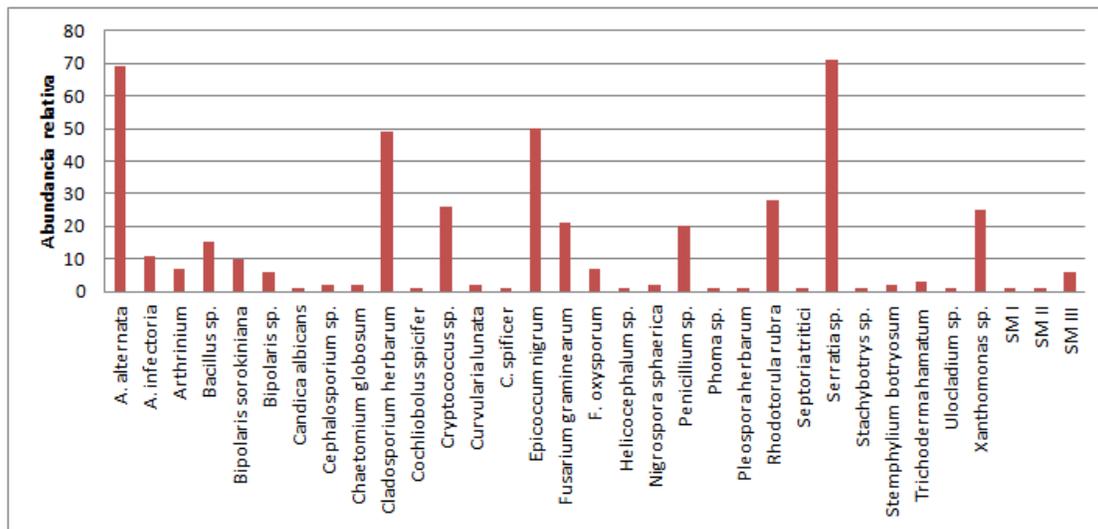


Figura 27. Abundancia relativa de especies endófitas en plantas de trigo.

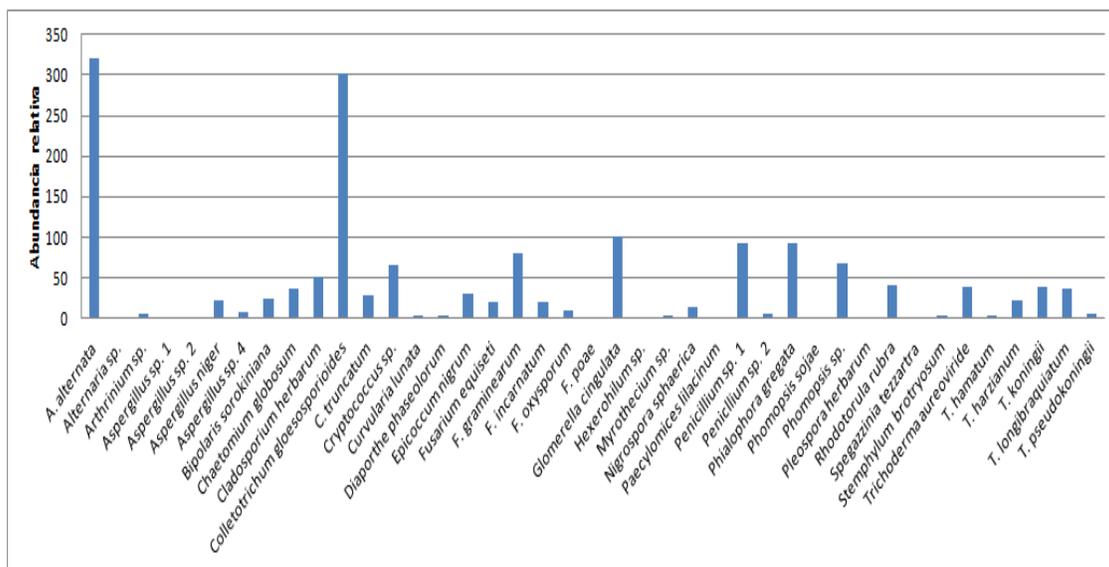


Figura 28. Abundancia relativa de especies endófitas en plantas de soja.

A continuación, se presentan los resultados del cálculo de la riqueza e índices de diversidad de los endófitos aislados del cultivar de trigo Buck Poncho y del primer año de soja a fines de su comparación. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Comparación de la riqueza específica e índices de diversidad de los endófitos aislados del cultivar Buck Poncho y de soja en una campaña agrícola

Órgano	Trigo			Soja		
	Riqueza específica	Índice de Shannon-Wiener (H')*	Índice de Simpson**	Riqueza específica	Índice de Shannon-Wiener (H')	Índice de Simpson
	Total			Total		
	17			32		
Hoja	12	2.19	0.12	21	1.98	0.25
Tallo	9	1.79	0.23	19	2.51	0.09
Gluma	4	1.08	0.36			
Vaina				16	1.21	0.51
Grano	6	1.4	0.27	8	1.19	0.46

Como puede verse, la soja presentó valores de riqueza mayores que el trigo. Las hojas mostraron las mayores riquezas en ambos hospedantes, si bien en soja hubo muy poca diferencia con respecto a la riqueza de los tallos. Por su parte, los índices mostraron la misma tendencia registrada anteriormente, en la que hubo una distribución más equitativa de las especies en las hojas en trigo y para los tallos en soja. Sin embargo, los valores de abundancia relativa de las poblaciones endofíticas de cada órgano del trigo y de la soja mostraron que algunas especies presentaron mayores frecuencias que en otras (Figura 29).

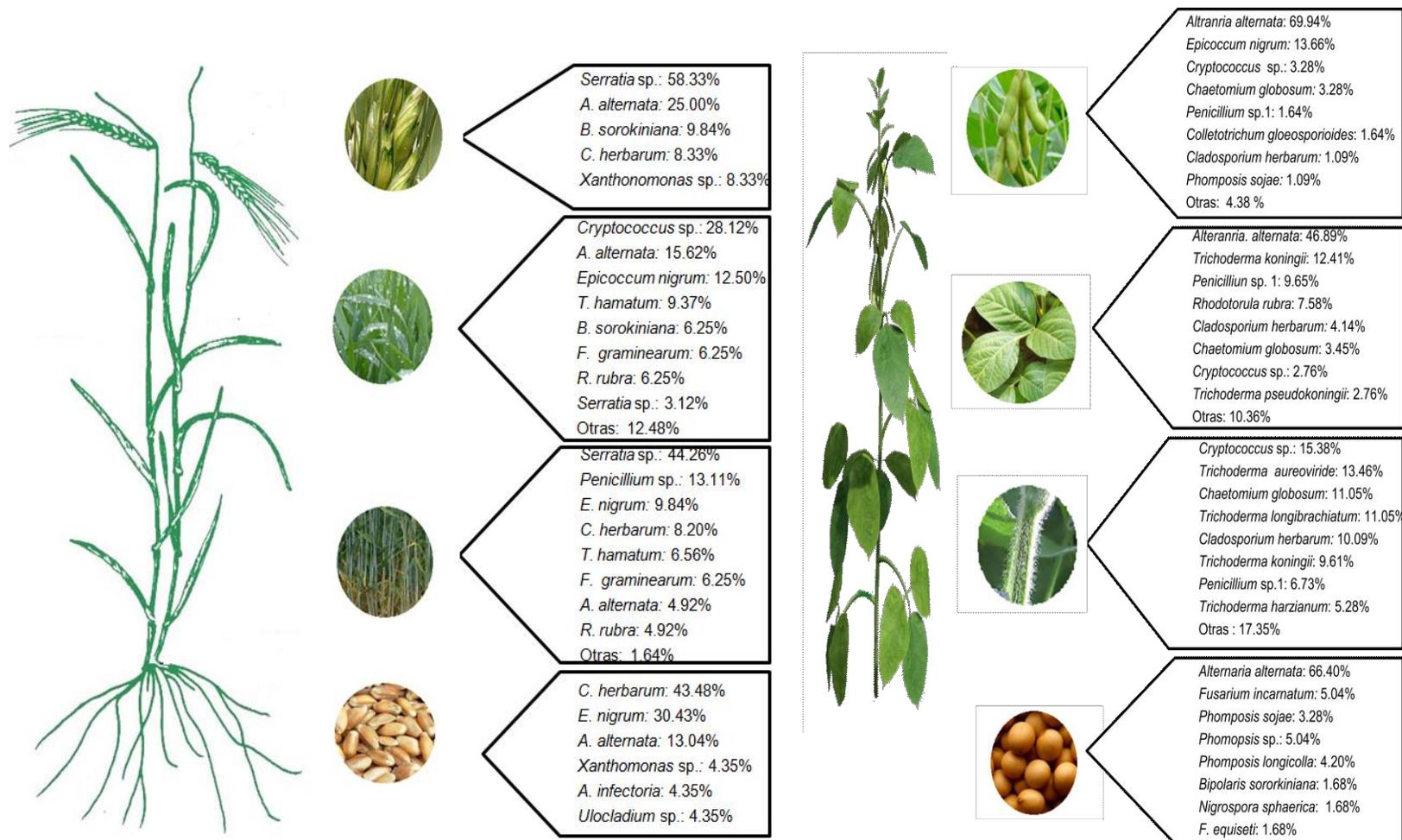


Figura 29. Abundancia relativa de los endófitos del trigo y de la soja en una campaña agrícola.

Con los datos obtenidos se elaboraron los diagramas de Venn a fines de comparar las especies endófitas compartidas en hojas, tallos y granos de ambos hospedantes y las que solo han sido registradas en cada uno ellos (Figura 30).

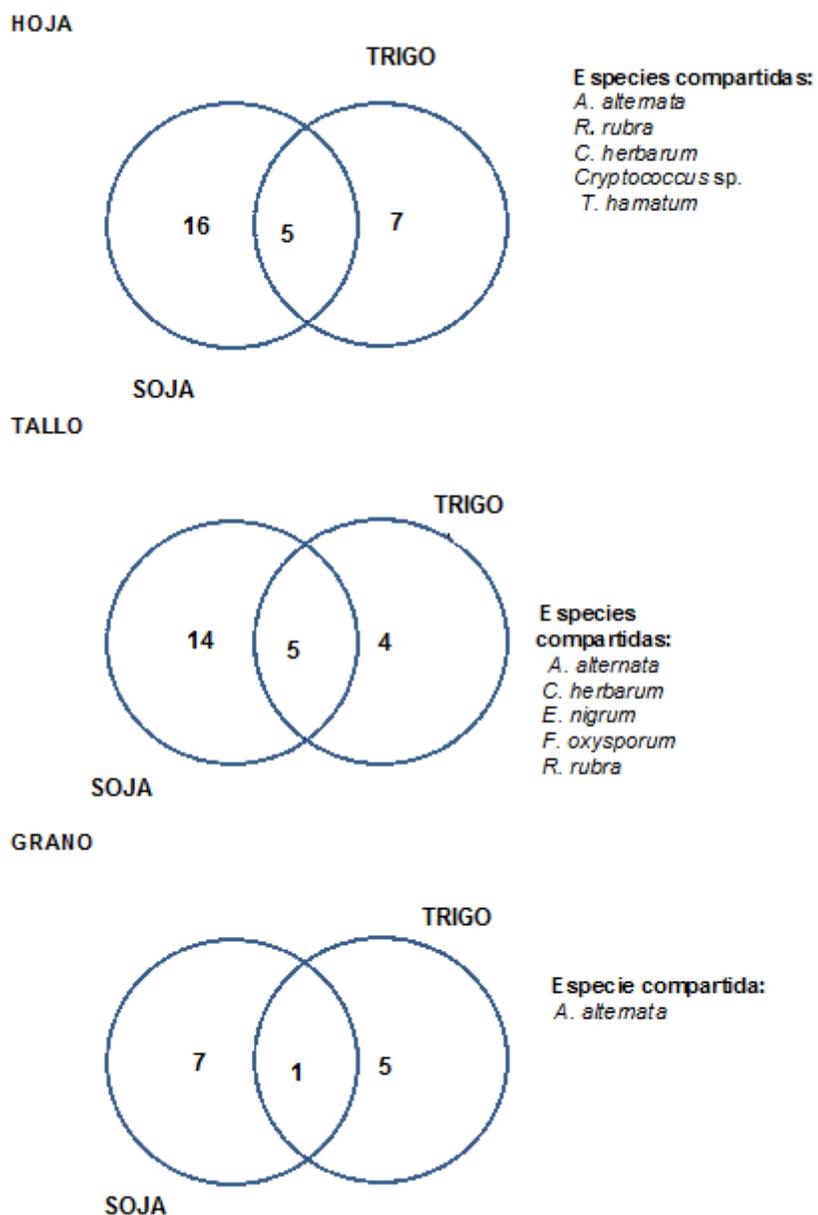


Figura 30. Diagramas de Venn. Endófitos compartidos por el trigo y la soja en hojas, tallos y granos.

Los diagramas de Venn muestran que los hospedantes estudiados albergan en las hojas y en los tallos más especies compartidas en comparación con los granos. A su vez, las hojas y los tallos comparten a *A. alternata*, *R. rubra* y *C. herbarum*, las cuales son especies comunes y frecuentes en diversos hospedantes y son consideradas generalistas.

4. DISCUSION. ENDÓFITOS ASOCIADOS A TRIGO Y SOJA

Los microorganismos endófitos forman parte de las comunidades microbianas de las plantas y si bien, los endófitos sistémicos de gramíneas han sido los más estudiados, una gran diversidad de endófitos no sistémicos o no clavicipitaceos son conocidos hasta la fecha, habiéndose encontrado en todas las especies vegetales analizadas y en los ecosistemas más variados (Arnold, 2007; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011).

La metodología utilizada en este trabajo para el estudio de los endófitos consistió en el uso de técnicas de aislamiento e incubación en medio de cultivo y la identificación tradicional de las especies sobre la base de las características culturales de las colonias y morfobiométricas de las estructuras reproductivas, haciendo uso de claves taxonómicas de rutina (Barnett y Hunter, 1972; Arx, 1974; Ellis, 1976). Hoy en día, existen opiniones variadas acerca del uso de técnicas de amplificación directa de ADN para el estudio de las comunidades endofíticas. Según algunos investigadores, las técnicas moleculares pueden verse obstaculizadas por la presencia de secuencias ambiguas depositadas en las bases de datos genómicos y por su parte, la identificación basada solo en características morfológicas se ve dificultada sea porque los endófitos no esporulan en medio de cultivo o no pueden ser equiparados con especies descritas, registrándose como “micelio estéril” (Arnold, 2007; Gomes Fernandes *et al.*, 2015). Asimismo, otra cuestión de importancia que surge al momento de seleccionar la técnica adecuada es la diversidad. Algunos autores han obtenido mayor diversidad específica con la metodología tradicional (Impullitti y Malvik, 2013), otros como Arnold *et al.* (2007) en cultivo directo de hojas de *Pinus taeda* aislaron diversos hongos pertenecientes a los Sordariomycetes, que no fueron identificados utilizando PCR; y, otros autores, analizando los endófitos foliares de diferentes especies, registraron diferentes taxa al utilizar amplificación directa y cultivo de tejidos (Arnold y Lutzoni, 2007). Sin embargo, algunos autores sostienen que en el estudio e identificación de los endófitos fúngicos, el uso de técnicas moleculares como la secuencia de análisis de la región ITS (internal transcribed spacer) del rDNA, así como la clásica taxonomía de hongos aislados basada en caracteres morfobiométricos son complementarios (Gomes Fernandes *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que el trigo y la soja hospedan diversas especies endófitas tal como ha sido encontrado por otros autores (Miller y Roy, 1982; Sieber *et al.*, 1988; Crous *et al.*, 1995; Chapaval Pimentel *et al.*, 2006; Dalal y Kulkarni, 2014a). Entre los endófitos del trigo fueron identificadas algunas

especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Bacillus* y *Xanthomonas*. Algunas especies de *Serratia* y *Bacillus* fueron reportadas previamente como endófitas de plantas de arroz, cítricos, maíz y zanahoria (Pérez *et al.*, 2009). En trigo, se han aislado diferentes cepas de *B. subtilis* (Liu *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2015) y *B. thuringiensis* (Tao *et al.*, 2014) y en soja, *B. endoradicis* sp. nov. (Zhang *et al.*, 2012).

En ambos hospedantes, han sido encontradas diversas especies pero solo pocas fueron registradas con altas frecuencias, coincidiendo con lo mencionado por diversos autores (Petrini *et al.*, 1992; Kobayashi y Palumbo, 2000, Larran *et al.*, 2000; 2001; 2002; Chapaval Pimentel *et al.*, 2006). La mayoría de las especies aisladas han sido registradas por otros autores como endófitos de estos hospedantes y de otras plantas de regiones templadas y tropicales (Spurr y Welty, 1975; Sieber *et al.*, 1988; Petrini *et al.*, 1992; Gindrat y Pezet, 1994; Larran *et al.*, 2002a, b). Algunos de los endófitos aislados en el trigo y la soja son especies comunes y frecuentes en la mayoría de los hospedantes siendo considerados “generalistas” y ubicuos, tales como *A. alternata* y *C. herbarum*. Otros, aislados con frecuencias menores son considerados especies “raras”, que podrían ser específicas del hospedante de acuerdo a lo sugerido por Arnold (2007). Por ejemplo, *Acremonium* sp. y *Helicocephalum* sp. aislados del trigo y *Spegazzinia tessarthra* y *Arthrimum* sp. encontrados en soja.

Entre los hongos endófitos más frecuentemente aislados del trigo se registraron a *A. alternata*, *C. herbarum*, *E. nigrum* y *Cryptococcus* sp. Estos resultados están en acuerdo con los obtenidos por Formento y Schutt de Varini (2009) quienes analizando los endófitos fúngicos de hojas de trigo encontraron como frecuentes a especies de los géneros *Nigrospora*, *Epicoccum* y *Alternaria* y con menores frecuencias a especies de *Arthrimum* y *Phomopsis*. Asimismo, cabe mencionar que varias de las especies aisladas del trigo en este trabajo pertenecen a especies abundantes del filoplano, consideradas saprófitos primarios, y patógenos menores del trigo asociados a la sintomatología conocida como “escudete negro” (Black point) o al enmohecimiento de espigas tales como especies de *Alternaria*, *C. herbarum*, *S. botrysum* y *Epicoccum* spp. Otros endófitos aislados con menores frecuencias como *F. graminearum*, *B. sorokiniana* y *C. lunata*, son especies de conocidos patógenos de importancia en el trigo (Zillinsky, 1984). En particular, se puede hacer una mención del endófito *Acremonium* sp. (antes *Cephalosporium* sp.) que fue aislado de tallos de trigo, el cual podría ser un patógeno en fase latente ya que existen antecedentes en nuestro país de la presencia de *C. gramineum* causando estrías necróticas en hojas (Perelló y Moreno, 2006). Por su parte, *C. globosum*, aislado del trigo

y de la soja, ha sido citado como endófito, saprófito y patógeno, siendo uno de los ejemplos de especies endófitas fúngicas que cumplirían múltiples roles ecológicos en la naturaleza (Arnold, 2007).

Asimismo, gran parte de los endófitos aislados de soja están citados como patógenos económicamente importantes en diferentes lugares del mundo, por ejemplo, el complejo *D. phaseolorum/Phomopsis sojae* causante del tizón de la vaina y del tallo y la podredumbre de la semilla, *P. longicolla*, que causa el tizón del tallo y decaimiento de semillas, especies de *Alternaria* entre ellas, *A. alternata* que ocasionan manchas foliares, manchas en vainas, podredumbre y deterioro de la semilla, *C. truncatum* causante de la antracnosis, diferentes especies de *Fusarium* como *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum* causantes de la podredumbre de semillas y *P. gregata* causante de la podredumbre marrón del tallo. Estos endófitos podrían ser patógenos latentes ya que es ampliamente conocido que la mayoría de los hongos patógenos de plántulas, plantas, vainas y semillas de soja tienen un período asintomático antes de la infección. Entre ellos, Sinclair (1991) menciona a *C. truncatum*, *C. gloeoporioides*, *D. phaseolorum*, *F. oxysporum*, *P. gregata* y *P. longicolla*. Por otro lado, diferentes especies del género *Trichoderma*, tales como *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* fueron aisladas de los tejidos de la soja, y *T. hamatum* de ambos hospedantes, algunas de las cuales son ampliamente conocidas por su potencialidad como agentes de biocontrol frente a diversos patógenos (Inbar *et al.*, 1996; Fállico *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2013).

De acuerdo a lo sugerido por diversos autores, las especies endófitas aisladas de ambos hospedantes que están relacionadas estrechamente con especies patógenas podrían ser cepas avirulentas o no patógenas, cepas capaces de ocasionar enfermedad bajo condiciones de stress o con un largo período latente, cepas virulentas pero poco competidoras con otros microorganismos presentes en el órgano considerado o cepas virulentas de otros hospedantes (Petrini, 1991; Arnold, 2007; Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

Algunos autores, han propuesto que ciertos endófitos pueden ser saprotrofos latentes que se activan con la muerte del órgano, colonizando anticipadamente los tejidos y aventajando en la competencia a los saprotrofos más tardíos. Como ejemplo, se han citado aislamientos endófitos y saprofitos de *Magnolia lilifera* L. pertenecientes a los géneros *Colletotrichum/Glomerella*, *Fusarium/Nectria*, *Phomopsis/Diaportha* que

mediante estudios demostraron que estaban estrechamente relacionados entre sí (Promputtha *et al.*, 2007).

En los ensayos realizados en trigo y soja se han encontrado variaciones cualitativas de las comunidades endófitas en los años evaluados, en los cuales se han presentado **condiciones ambientales diferentes**. Estos resultados coinciden con algunos autores quienes han mencionado que la estructura de las comunidades endofíticas, su abundancia y diversidad, es dinámica y está influenciada por el hospedante y por las condiciones bióticas y abióticas del sitio del muestreo como la localización geográfica, la biogeogeografía, las condiciones del suelo, las interacciones entre microorganismos y entre el hospedante y los microorganismos (Petrini *et al.*, 1992; Arnold, 2007; Gaiero *et al.*, 2013). Se ha demostrado la dinámica de las poblaciones de endofitos asociados a hojas de coníferas debida a las condiciones ambientales del sitio del muestreo tales como la humedad, precipitaciones y niebla (Arnold, 2007). La lluvia es considerada por diversos autores un factor importante en el aumento de las frecuencias de infección al incidir sobre la dispersión de los endófitos (Carroll y Carroll, 1978, Petrini y Müller, 1979; Luginbühl y Müller, 1980).

En este sentido, algunas especies fueron aisladas en ambos años, pero con mayores frecuencias en el segundo como *A. alternata* y *Phoma* sp. en trigo y *A. alternata* y *Penicillium* sp. 1 en soja. Otras especies fueron encontradas solo en el segundo año como *C. gloeosporioides*, *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus* sp. 2 y *Penicillium* sp. en trigo y *C. gloeosporioides*, *F. equiseti* y *F. incarnatum* en soja. Asimismo, puede sugerirse que las las mayores frecuencias de *Bacillus* sp. en hojas de trigo en el primer estadio del segundo año podrían explicarse por los mayores valores de humedad y precipitaciones durante ese año lo cual proporciona mayor humedad en el suelo propicio para la movilidad de las bacterias a la planta, considerando que las raíces constituyen la vía de ingreso de las bacterias endófitas (Hallmann *et al.*, 1997; Quadt-Hallmann *et al.*, 1997a; Quadt-Hallmann *et al.*, 1997b).

A su vez, cabe destacar que durante los años con mayores precipitaciones y humedad ambiental fueron aislados más endófitos asociados a especies patógenas. Por ejemplo, en soja en el año más húmedo se observó un incremento de *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *G. cingulata*, *P. gregata*, *F. graminearum*, *P. sojae* y *C. truncatum* y en trigo, de *A. alternata* y de las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Por el contrario, en el año más seco se aislaron de soja más especies del género *Trichoderma* y con mayores frecuencias que en el año húmedo.

Debe considerarse que debido a lo mencionado por diversos autores la mayoría de los endófitos no-clavicipitaceos se transmiten horizontalmente a través de esporas, por lo cual las condiciones ambientales influirían en su germinación afectando las frecuencias de infección de las plantas (Arnold, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009). En este sentido, algunos autores han correlacionado positivamente las frecuencias de infección con las precipitaciones y negativamente con la elevación geográfica (Carroll y Carroll, 1978).

Considerando que en los estudios de diversidad endofítica de un hospedante es tan importante aislar las especies dominantes como las menos frecuentes, el tamaño de la muestra juega un rol de importancia, habiéndose demostrado que el incremento en su número aumenta el número de especies aisladas (Petrini, 1992; Gamboa *et al.*, 2002; Bayman, 2006). Esto podría explicar la mayor diversidad endofítica encontrada en soja en comparación con la del trigo debido a que en soja se analizaron más muestras por órgano y estadíos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que hay diversos factores que pueden influenciar en los estudios de diversidad endofítica además del número de muestras tales como la superficie de las muestras, el estado nutricional de las plantas y el contenido de agua, entre otras, lo cual hace dificultosa la comparación de resultados con otros estudios (Gomes Fernandes *et al.*, 2015).

En los resultados obtenidos en trigo no se encontraron diferencias en las comunidades endofíticas de los diferentes **cultivares** cuando fueron analizados todos los órganos juntos lo cual acuerda con lo encontrado por Sieber *et al.* (1988), sin embargo hubo diferencias significativas solo para las glumas cuando se analizaron separadamente.

En ambos hospedantes se obtuvieron diferencias en las poblaciones endofíticas de los **órganos** analizados tal como lo citado por autores que han demostrado para algunos endófitos “órgano-especificidad” (Petrini *et al.*, 1992; Tejesvi *et al.*, 2005; Arnold, 2007; Zabalgozcoa, 2008; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Por ejemplo, en trigo, *N. sphaerica*, *Phoma* sp., *P. herbarum*, *Stachybotrys* sp. y *S. tritici* fueron encontrados solo en las hojas mientras que *Cephalosporium* sp. y *Helicocephalum* sp. estuvieron presentes solamente en tallos mientras que *Candida albicans* solo se aisló de granos. Estos resultados están en acuerdo con lo obtenido por Sieber *et al.* (1988) y Crous *et al.* (1995) quienes demostraron la ocupación preferencial o restringida de algunos endófitos a un órgano en particular en plantas de trigo. Como ejemplos, en soja pueden mencionarse a *Aspergillus* sp. 1, *Leptosphaeria* sp. y *T. hamatum* que solo fueron aislados de hojas y *Spegazzinia tessartha*, *D. phaseolorum* y *M. striatisporum* solamente registrados en tallos, mientras que *P. herbaum* solo fue aislado de vainas. Por lo mencionado, podría sugerirse que

algunas especies ocuparían preferencialmente determinados órganos de estos hospedantes tal como lo mencionado por estos autores. Cabe mencionar aquí que si bien los estudios realizados por Sieber *et al.* (1988) registraron mayores porcentajes de infección en tallos que en hojas, la riqueza específica fue mayor en las hojas sugiriendo que esto fue debido a los altos porcentajes de presencia de *S. nodorum* en los tallos y a que no registraron endófitos en las secciones de vainas de hojas analizadas.

En este trabajo, en trigo las hojas presentaron los valores más altos de riqueza de especies endófitas (27) mientras que en soja la mayor riqueza correspondió al tallo (34). En ambos hospedantes, las especies tuvieron una distribución moderadamente equitativa, lo cual ha sido demostrado por los valores de los índices de Shannon-Wiener y Simpson. Sin embargo, en la comparación realizada para un año de trigo y soja, las hojas fueron las que presentaron las mayores riquezas si bien en soja con poca diferencia. Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que se han registrado elevadas tasas de infección en hojas y altos valores de diversidad (Arnold *et al.*, 2000; Arnold, 2007; Gomes Fernandes *et al.*, 2015). Otros autores, por su parte (Chapaval Pimentel *et al.*, 2006) no encontraron diferencias en el número de especies endófitas aisladas de hojas y tallos.

Diferentes autores demostraron alta diversidad endofítica en las hojas al estudiar diferentes hospedantes (Arnold *et al.*, 2000; Gamboa *et al.*, 2002; Arnold y Herre, 2003; Arnold, 2007) sugiriendo que esta diversidad podría deberse a que este órgano constituye una de las interfases más dinámicas entre las plantas y el ambiente y, a su vez por la transmisión horizontal de los endófitos, los cuales se mueven por corrientes de aire, germinan y penetran en las hojas en diferentes condiciones de radiación, humedad y desecación. Por el contrario, los granos presentaron menores valores de riqueza en comparación con las hojas así como menor diversidad específica mostrando una marcada tendencia hacia la dominancia de acuerdo a los valores de los índices. Cabe destacar también que los endófitos más frecuentemente aislados de semillas de soja fueron especies reconocidas como patógenos de semillas (*A. alternata* y *F. graminearum*).

Asimismo, en este trabajo se han registrado cambios cuali-cuantitativos en las frecuencias de los endófitos en los **estadios a lo largo del ciclo del cultivo** del trigo y de la soja demostrándose la dinámica que presentan tanto espacial, ya mencionada para los órganos, como temporal. Estos resultados están en acuerdo con lo encontrado por Sieber *et al.* (1988) quienes demostraron variaciones cuali-cuantitativas de la micoflora endofítica en los tejidos a lo largo del ciclo fenológico del cultivo y, sugirieron que las variaciones

temporales podrían ser ocasionadas por la existencia de una relación entre los porcentajes de infección y la superficie verde de la hoja. Ciertos autores han relacionado estas variaciones con la disminución de nutrientes durante la maduración de los órganos y senescencia de las plantas, los cuales son necesarios para la vida de los microorganismos (McInroy y Kloepper, 1995). De acuerdo a los estudios realizados por Cabral y Collantes (1992) en *E. viminalis* la dinámica de las comunidades endofíticas de las hojas si bien es influenciada por las condiciones ambientales sería más dependiente de la edad de las hojas. Estudios realizados recientemente en India en soja están en acuerdo con los resultados encontrados en este trabajo demostrándose el mayor número de especies endofíticas en los estadios vegetativos en comparación con los reproductivos y pero con menores porcentajes de infección sugiriendo que la edad de los tejidos afecta la población endofítica (Dalal y Kulkarni, 2014a).

En trigo, se pueden mencionar algunas especies endofíticas que aumentaron sus frecuencias con el avance del ciclo como *A. alternata* y *C. herbarum* coincidiendo con otros trabajos realizados previamente (Larran *et al.*, 2002a). En soja, las especies que aumentaron con el avance del ciclo fueron especies conocidas como patógenos que ocasionan enfermedades de fin de ciclo como *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *G. cingulata*, *Phomopsis sojiae*, *Phomopsis* sp. Otras especies por el contrario disminuyeron como *B. sorokiniana*, *C. globosum*, *C. herbarum* y *R. rubra*, entre otras.

5. CONCLUSIONES

El trigo y la soja hospedan comunidades endofíticas diversas representadas por un gran número de especies, aunque solo algunas fueron aisladas con altas frecuencias. La composición de las comunidades endofíticas además de depender del hospedante varió con las condiciones ambientales del sitio del muestro. Algunas especies estuvieron presentes en ambos hospedantes con altas frecuencias como *A. alternata* y *C. herbarum*, las que son consideradas especies ubicuas.

Las comunidades mostraron una dinámica espacial evidenciada en las variaciones cuali-cuantitativas en los diferentes órganos analizados, lo cual podría ser el resultado de una adaptación de las especies a las condiciones microecológicas y fisiológicas presentes en ese órgano. A su vez, presentaron una dinámica temporal con variaciones cuali-cuantitativas de las especies a lo largo de los ciclos fenológicos de ambos cultivos.

La comparación de las comunidades endofíticas de ambos hospedantes mostró que la riqueza específica fue mayor en soja que en trigo, así como, que los órganos que presentaron mayores valores de riqueza fueron las hojas y los tallos. A su vez, la aplicación de los índices de diversidad reveló valores con una tendencia a la distribución equitativa de las especies, si bien algunas de ellas fueron marcadamente más abundantes según hospedante y órgano.

El espectro de endófitos registrados en ambos hospedantes incluyó especies potenciales o latentes saprófitos, probables simbiontes naturales y especies relacionadas a conocidos patógenos. La mayoría de las especies aisladas del trigo y de la soja pertenecieron al Phylum Ascomycota y dentro de éstos la mayor proporción perteneció a la clase Dothidiomycetes en trigo y a la clase Sordariomycetes en soja y en menor proporción a las clases Eurotiomycetes y Leotiomycetes.

CAPITULO III. ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA ENDOFITICA DEL TRIGO FRENTE A *Pyrenophora tritici-repentis*²

² El contenido de este capítulo ha sido parcialmente publicado con anterioridad en Larran *et al.*, 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot. *Biological Control* 92: 17-23 citado en las referencias.

1. Antecedentes

Los estudios de endófitos del trigo realizados a la actualidad han demostrado que la mayoría de ellos son simbioses facultativos, sin embargo su rol en las plantas ha sido escasamente estudiado (Sieber *et al.*, 1988; Crous *et al.*, 1995). Existe muy poca evidencia de la evaluación de hongos endófitos del trigo en el biocontrol de patógenos, pudiéndose mencionar entre ellos a los estudios realizados en plántulas con especies de *Chaetomium* y *Phoma* sp. En estos, se demostró que la inoculación simultánea de suspensiones de esporas de estos cultivos fúngicos o sus extractos celulares con suspensiones de urediniosporas de *Puccinia triticina*, agente causal de la roya anaranjada, redujeron la densidad y el tamaño de las pústulas en las plántulas. Los autores sugirieron que esta interacción fue mediada por mecanismos de inducción de defensas en el hospedante (Dingle y McGee, 2003). A su vez, Istifadah *et al.* (2006) demostraron que diferentes especies de endófitos de trigo del género *Chaetomium* como *C. olivaceum* Cooke & Ellis, *C. globosum* Kunze ex Fr., *C. cochliodes* Pallise y *C. dolichotrichum* Ames. inhibieron el crecimiento de *P. tritici-repentis* al enfrentarlos en cultivos duales o utilizando sus cultivos filtrados. Todas las especies utilizadas en estas pruebas redujeron al patógeno, sin embargo, se destacó por su efecto *C. globosum*. Por su parte, Istifadah y McGee (2006) realizaron estudios *in planta* demostrando que dos aislamientos endofíticos de *C. globosum* y sus cultivos filtrados aplicados a hojas de plántulas de trigo redujeron el desarrollo de la mancha amarilla del trigo y de acuerdo a sus resultados sugirieron que el efecto antagonista fue mediado por la activación de las defensas del hospedante.

Considerando estos antecedentes, el objetivo del presente capítulo fue evaluar la capacidad antagónica potencial de especies endófitas del trigo para el biocontrol de *P. tritici-repentis*.

A fines de dar cumplimiento a este objetivo, preliminarmente a partir de las colecciones de endófitos aislados en los anteriores ensayos se realizó una selección de las especies a utilizar considerando aquellas que estuvieran presentes en altas frecuencias en diversos órganos del trigo (*A. alternata* y *Bacillus* sp.), ya que estos podrían estar adaptados a los tejidos, así como aquellas que no fueran especies de conocidos patógenos de este hospedante o por la existencia de antecedentes como agentes de biocontrol. De este modo, fueron seleccionadas para las pruebas de biocontrol frente a *P. tritici-repentis* (*Ptr*) las siguientes especies: *A. alternata*, *Bacillus* sp., *C. globosum*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *R. rubra*, *T. hamatum* y *P. lilacinus*.

2. Materiales y métodos

2.1. Pruebas de patogenicidad

A los fines de corroborar que las especies a utilizar no fueran patógenas del trigo se diseñó un ensayo para testear su patogenicidad. Los endófitos fueron cultivados para la obtención del inóculo en placas de Petri conteniendo agar nutritivo para el crecimiento de *Bacillus* sp. o APG al 2% para las especies fúngicas. Las placas fueron incubadas en estufa a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 y 10 días, respectivamente.

Se sembraron semillas de trigo del cultivar Buck Poncho en envases plásticos que fueron mantenidos en condiciones semicontroladas de invernáculo ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ y control de riego). A los 30 días de la germinación, 8 plántulas (4 unidades x 2 envases) fueron asperjadas hasta chorreo con una suspensión de 2×10^6 conidios/ml de cada uno de los endófitos preparada en agua destilada estéril conteniendo 0.1% (v/v) de Tween 20 y ajustada con hematocitómetro de Neubauer. *R. rubra* y *Bacillus* sp. fueron aplicados a una concentración de 1×10^8 UFC/ml, ajustadas utilizando un espectrofotómetro (densidad óptica de 600 nm), equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland. El tratamiento control consistió en plántulas asperjadas solo con agua destilada estéril con el agregado de Tween 20. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento y el ensayo fue realizado 2 veces. Todas las plantas se mantuvieron en cámara húmeda con bolsas plásticas durante 48 h. Luego, fueron mantenidas en invernáculo a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y observadas durante 14 días para corroborar que los endófitos evaluados no ocasionaran síntomas que podrían indicar su patogenicidad.

2. 2. Pruebas en condiciones controladas *in vitro*

2.2.1. Cultivos duales

Para el ensayo se utilizó un aislamiento monospórico de *Ptr* (LH 019), el cual fue originalmente obtenido de plantas infectadas de trigo sembrado en la EEJH de la FCAYF, UNLP, Buenos Aires, Argentina y mantenido en APG al 2% a 5°C en la Colección del CIDEFI. Luego, fue cultivado en APG al 2% e incubado en estufa a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ para su multiplicación y utilización como inóculo.

Los endófitos seleccionados en la prueba anterior (endófitos no patógenos) *A. alternata*, *Bacillus* sp., *C. globosum*, *C. herbarum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *P. lilacinus*, *R. rubra* y *T. hamatum* fueron analizados por su capacidad antagonica frente a *Ptr* a través de la evaluación

de la inhibición del crecimiento del patógeno y la interferencia hifal utilizando la técnica de cultivos duales.

Para ello, se tomaron discos de 6 mm de diámetro de la sección periférica de las colonias de 10 y 7 días de los hongos endófitos y de *Ptr* respectivamente, creciendo en APG al 2%. Los discos de los endófitos y del patógeno (concentración aprox.: 10^5 conidios/ml, recuento realizado en cámara de Neubauer) se sembraron enfrentados a 3.5 cm en placas de Petri de 9 cm conteniendo APG al 2%. *Bacillus* sp. y *R. rubra* se sembraron con ansa a partir de colonias desarrolladas en agar nutritivo y en APG al 2%, respectivamente. Las concentraciones de estos microorganismos fueron ajustadas previamente a 1×10^8 UFC/ml (equivalente a 0,5 de la escala de McFarland) por recuento de UFC/ml en agar nutritivo para *Bacillus* sp. y con espectrofotómetro para *R. rubra*. El control se realizó sembrando discos del patógeno solo, en placas de Petri conteniendo APG al 2%. Todos los tratamientos se incubaron en estufa a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento. A los 3, 7, 11 y 15 días de la siembra se efectuaron mediciones del diámetro (cm) de las colonias del patógeno (*Ptr*) en dos direcciones perpendiculares (diámetro 1: diámetro perpendicular a la dirección del endófito y diámetro 2: diámetro en la dirección del endófito) calculándose luego la media. En algunos tratamientos, las mediciones fueron discontinuadas cuando el patógeno llegó al borde de la placa de Petri. Se obtuvieron las tasas de crecimiento del patógeno: tasa 1, tasa 2 y tasa 3, para cada intervalo de tiempo evaluado 3 a 7; 7 a 11, y 11 a 15 días respectivamente. Cada una de las tasas de crecimiento se calculó de la siguiente manera: valor de la media del diámetro de la colonia en el tiempo t_n – valor de la media del diámetro de la colonia en el tiempo t_{n-1} /número de días del intervalo (4 días). El ensayo fue realizado 2 veces.

A los 20 días de la siembra se evaluaron los tipos de interacciones endófito-patógeno de acuerdo a las observaciones realizadas por Porter (1924) y Dickinson y Boardman (1971). Con la finalidad de observar alteraciones miceliales y/o conidiales de *Ptr* se tomaron 3 secciones de la zona de contacto o interferencia entre colonias (patógeno-endófito) y de los márgenes de las colonias testigo observándose al microscopio óptico (200 y 400X).

Análisis estadístico

Se realizaron ANAVA con los resultados obtenidos de las medias de los diámetros de las colonias de *Ptr* y de las tasas de crecimiento utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) para mediciones repetidas con los experimentos, tiempos de evaluación y endófitos como factores. Las medias fueron comparadas con el test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009),

2.2.2. Germinación de esporas

El experimento se diseñó para evaluar el efecto antagonista de los endófitos *Bacillus* sp., *C. globosum*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *P. lilacinus*, *R. rubra* y *T. hamatum* frente a *Ptr* en suspensiones pareadas patógeno-antagonista. Para ello, se pipetearon dentro de portaobjetos cavados 2 gotas de 25 μ l cada una (total 50 μ l) de suspensiones de las diferentes combinaciones patógeno y endófito. Se realizó un tratamiento testigo que consistió en la colocación de gotas con la suspensión del patógeno solo. Las suspensiones se obtuvieron a partir de colonias desarrolladas en APG al 2% y para *Bacillus* sp. y *R. rubra* en agar nutritivo. Las concentraciones conidiales para *Ptr* y los hongos endófitos fueron de 2×10^5 y 2×10^6 conidios/ml, respectivamente. Las concentraciones de las suspensiones utilizadas para *R. rubra* y *Bacillus* sp. fueron de 1×10^8 UFC/ml ajustadas como se describió para las pruebas de patogenicidad. Las placas de vidrio se incubaron en cámara húmeda a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 48 h y luego fueron examinadas utilizando microscopio óptico. Se evaluó la germinación de las esporas de *Ptr* observando 5 campos microscópicos a 200 y 400 X para cada tratamiento, realizándose tres repeticiones. Un conidio fue considerado germinado cuando el tubo germinativo fue más largo que la mitad del largo del conidio. Se calculó luego el porcentaje de germinación conicial observándose alteraciones en el tamaño de los conidios, plasmólisis o formación de vesículas comparándose con los conidios del testigo.

Análisis estadístico

Los datos fueron transformados ($\arcsin \sqrt{x}$) para homogeneizar la varianza residual. Se realizó un ANAVA utilizando el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009). Las medias fueron comparadas con el test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$).

2.3. Prueba en condiciones semicontroladas *in vivo*

El objetivo del ensayo fue determinar el potencial de los endófitos *Bacillus* sp., *C. globosum*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *P. lilacinus*, *R. rubra* y *T. hamatum* pre-inoculados en hojas de trigo como antagonistas frente a *Ptr* en plántulas mantenidas en invernáculo. El ensayo fue diseñado con dos experimentos al azar, sembrándose semillas del cultivar Buck Poncho en macetas plásticas de 12 cm de diámetro en invernáculo con temperaturas de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperíodo de 14 h. El sustrato consistió de una

mezcla de tierra estéril, arena y perlita en una proporción de 50:35:15. Esta preparación fue previamente tinalizada en autoclave, en bolsas de nylon a 100°C durante 30 minutos, repitiéndose 3 veces y luego distribuida en las macetas.

Cada unidad experimental consistió en una maceta con 5 plantas. Las plántulas fueron inoculadas en el estadio 15 según la escala de Zadoks *et al.* (1974) hasta chorreo con suspensiones de cada uno de los endófitos utilizando un aspersor. Los endófitos fueron aplicados a las hojas de trigo 24 h antes que el patógeno. Las suspensiones del patógeno y de los endófitos fueron preparadas, a partir de cultivos de 4 días para *Bacillus* sp. y de 10 días para las especies fúngicas, en agua destilada estéril adicionada de Tween 80 al 0.02% y luego filtradas. Las concentraciones conidiales de *Ptr* y de los hongos endófitos fueron ajustadas con hematocitómetro de Neubauer a 2×10^5 y 2×10^6 conidios/ml, respectivamente mientras que las concentraciones utilizadas para *Bacillus* sp. y *R. rubra* fueron ajustadas con espectrofotómetro a 1×10^8 UFC/ml como se describió con anterioridad. Los testigos consistieron en plántulas inoculadas solo con la suspensión del patógeno. Todas las plántulas se incubaron en bolsas plásticas durante 48 h y luego fueron mantenidas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en invernáculo. A los 12 días se evaluó visualmente la severidad de la mancha amarilla en las 3 hojas más jóvenes de cada una de las plantas de cada tratamiento por estimación de la superficie (%) con lesiones elípticas (considerando clorosis y área necrosada) respecto a la superficie total de las hojas. Se realizaron dos ensayos con número variable de repeticiones.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se realizó un ANAVA con un diseño completamente al azar desbalanceado, con los endófitos y experimentos como factores, debido a que en ciertos tratamientos algunas plantas no pudieron ser evaluadas por el efecto de adversidades ajenas al ensayo. De esta manera, algunos tratamientos tuvieron 4 repeticiones mientras que otros variaron entre 3 y 10. Los datos fueron transformados ($\arcsen \sqrt{x}$) para obtener una distribución normal.). Las medias fueron comparadas con el test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

3. Resultados

3.1. Pruebas de patogenicidad

Los resultados de los test de patogenicidad demostraron que los endófitos evaluados no causaron síntomas en las plantas de trigo inoculadas, por lo cual fueron consideradas para su evaluación como potenciales agentes de biocontrol frente a *Ptr* (Figura 29).



Figura 31. Pruebas de patogenicidad de los endófitos en trigo.

3.2. Pruebas en condiciones controladas *in vitro*

3.2.1. Cultivos duales

Los resultados obtenidos al enfrentar los endófitos con *Ptr* en cultivos duales mostraron que hubo diferencias significativas entre los endófitos, los tiempos de evaluación (3, 7, 11 y 15 días) y en la interacción endófitos × tiempos de evaluación, con respecto al crecimiento de las colonias de *Ptr* (diámetros y tasas) (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. ANAVA del efecto de los endófitos frente a *Pyrenophora tritici-repentis* en cuatro tiempos de evaluación en cultivos duales (diámetros).

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Experimentos	1	0.27	0.595
Endófitos	9	144.41	≤0.001
Experimentos × endófitos	9	0.46	0.884
Error	60	0.96	
Tiempos de evaluación	3	159.21	≤0.001
Tiempos de evaluación × experimentos	3	0.09	0.307
Tiempos de evaluación × endófitos	27	9.57	≤0.001
Tiempos de evaluación × experimentos x endófitos	27	0.16	0.015
Error	180	0.08	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Tabla 21. ANAVA para las tasas de crecimiento de *Pyrenophora tritici-repentis* frente a los endófitos en cultivos duales en cuatro tiempos de evaluación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado	Valor de P*
Experimentos	1	0.002	0.504
Endófitos	9	0.841	≤0.001
Experimentos x endófitos	9	0.006	0.218
Error	57	0.005	
Tiempos de evaluación	2	8.602	≤0.001
Tiempos de evaluación x experimentos	2	0.019	0.147
Tiempos de evaluación x endófitos	18	0.578	≤0.001
Tiempos de evaluación x experimentos x endófitos	18	0.020	0.014
Error	120	0.009	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Todos los endófitos, excepto *R. rubra* redujeron significativamente el crecimiento de *Ptr* a los 11 y 15 días posteriores a la inoculación comparados con el control (Tabla 22). Como puede observarse, este efecto fue más marcado en los primeros días de crecimiento tal como lo demuestran los valores de la tasa entre los 3 y 7 días (T1), mientras que las tasas entre los 7 y 11 días (T2) y 11 y 15 días (T3) fueron bajas. En algunos casos, la tasa fue nula debido a la detención del crecimiento del patógeno y en otros a que llegó al borde de la placa de Petri.

Tabla 22. Medias de los diámetros y tasas de crecimiento de *Pyrenophora tritici-repentis* en presencia de endófitos de trigo, en cuatro tiempos de evaluación.

	Medias del diámetro de crecimiento de <i>P. tritici-repentis</i> (cm)				Tasas de crecimiento (T)** (cm/día)		
	3**	7	11	15	T 1	T 2	T 3
<i>P. tritici-repentis</i> (control)	3.06 d*	8.80 e	9.00 e	9.00 e	1.43 e	0.05 a	0.00 a
<i>Alternaria alternata</i>	2.90 cd	6.08 c	6.22 c	6.41 c	0.79 c	0.03 a	0.05 a
<i>Bacillus</i> sp.	1.39 a	2.49 a	2.72 b	2.86 b	0.25 b	0.08 a	0.03 a
<i>Chaetomium globosum</i>	3.05 d	6.22 c	6.28 c	6.44 c	0.79 c	0.01 a	0.04 a
<i>Cladosporium herbarum</i>	2.95 cd	6.00 c	7.64 d	8.03 d	0.76 c	0.41 b	0.01 a
<i>Fusarium</i> sp.	2.89 cd	6.19 c	6.24 c	6.32 c	0.83 c	0.01 a	0.02 a
<i>Penicillium</i> sp.	1.91 ab	2.10 a	2.11 a	2.11 a	0.04 a	0.00 a	0.00 a
<i>Paecilomyces lilacinum</i>	2.44 bc	3.22 b	3.22 b	3.22 b	0.20 b	0.00 a	0.00 a
<i>Rhodotorula rubra</i>	3.07 d	7.50 d	9.00 e	9.00 e	1.10 d	0.38 b	0.00 a
<i>Trichoderma hamatum</i>	1.73 ab	1.90 a	1.90 a	1.90 a	0.04 a	0.00 a	0.00 a

*Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes. Test de F ($P \leq 0.05$); **Tiempos de evaluación: 3, 7, 11 y 15 días; ***Tasa: crecimiento de *Ptr* para cada uno de los intervalos de evaluación: 3 a 7 (T1); 7 a 11 (T2) y 11 a 15 (T3). Cálculo de la tasa= media del diámetro de la colonia en el tiempo t_n – media del diámetro de la colonia en el tiempo t_{n-1} / número de días del intervalo (4 días).

En todos los tiempos evaluados *T. hamatum*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. y *P. lilacinus* fueron los endófitos que produjeron un mayor efecto antagonista, como puede observarse a través de la reducción del diámetro de la colonia de *Ptr* en comparación con el control. A los 20 días de la siembra de las diferentes combinaciones endófito-patógeno en cultivos duales se realizó la evaluación macroscópica para determinar el tipo de interacciones en cada uno. A continuación se presentan los distintos tipos:

- Tipo A: ambos crecen: *Ptr* - *A. alternata* y *Ptr-Fusarium* sp. (Figura 32A);
- Tipo B: ambos crecen y luego el patógeno detiene su crecimiento: el endófito crece sobre el patógeno: *Ptr-Penicillium* sp., *Ptr-P. lilacinus* (Figura 32B); el endófito rodea al patógeno: *Ptr-T. hamatum*, *Ptr-C. herbarum* y *Ptr-C. globosum* (Figura 32C);
- Tipo D: inhibición mutua a una distancia de más de 2 mm (ej. *Ptr-Bacillus* sp. (Figura 32D).

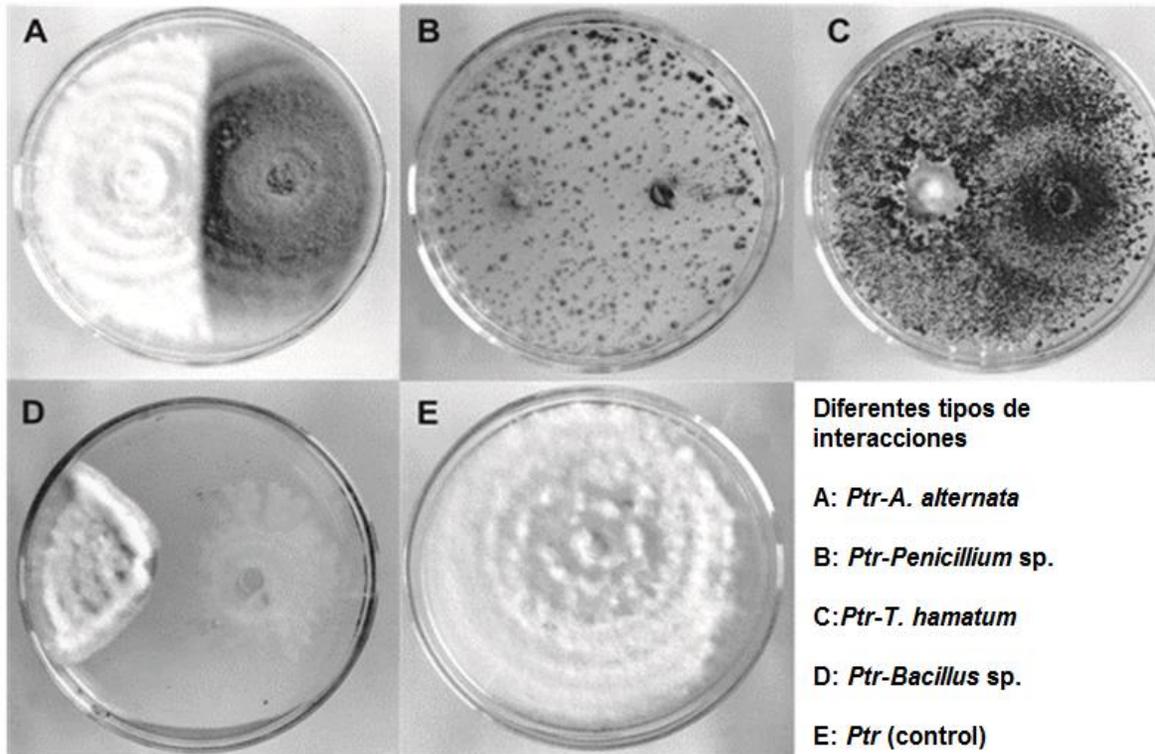


Figura 32. Interacción de *P. tritici-repentis* en cultivos duales (APG al 2%).

Los resultados de la examinación microscópica de *Ptr* de la zona de interferencia con los endófitos en los cultivos duales y de la zona perimetral de las colonias del control mostraron alteraciones en la morfología de hifas y conidios en comparación con el testigo (Tabla 23) (Figura 33). Todos los endófitos excepto *C. herbarum* y *A. alternata* ocasionaron alteraciones del patógeno.

Tabla 23. Alteraciones de hifas y conidios de *P. tritici-repentis* en las zonas de proximidad con endófitos, en cultivos duales

Cultivos duales	Alteraciones conidiales de <i>Ptr</i>	Alteraciones en hifas de <i>Ptr</i>
<i>Ptr-Bacillus</i> sp.	Plasmólisis	Pigmentación
	Tubos germinativos cortos	Formación de vesículas
	Formación de vesículas (Figura 33F)	
<i>Ptr-T. hamatum</i>	Plasmólisis	Plasmólisis. (Figura 33C)
		Zonas de melanización (Figura 33D)
<i>Ptr-Fusarium</i> sp.	Plasmólisis	
	Tubos germinativos cortos	
<i>Ptr-C. globosum</i>	Plasmólisis	Pigmentación. Precipitados anaranjados en hifas
	Tubos germinativos cortos	
<i>Ptr-Penicillium</i> sp.	Plasmólisis (Figura 33G)	Precipitados pigmentados (Figura 33B)
	Tubos germinativos cortos	Formación de clamidosporas (Figura 33B)
<i>Ptr-R. rubra</i>	Plasmólisis	
	Tubos germinativos cortos	
<i>Ptr-P. lilacinus</i>	Plasmólisis	Pigmentación

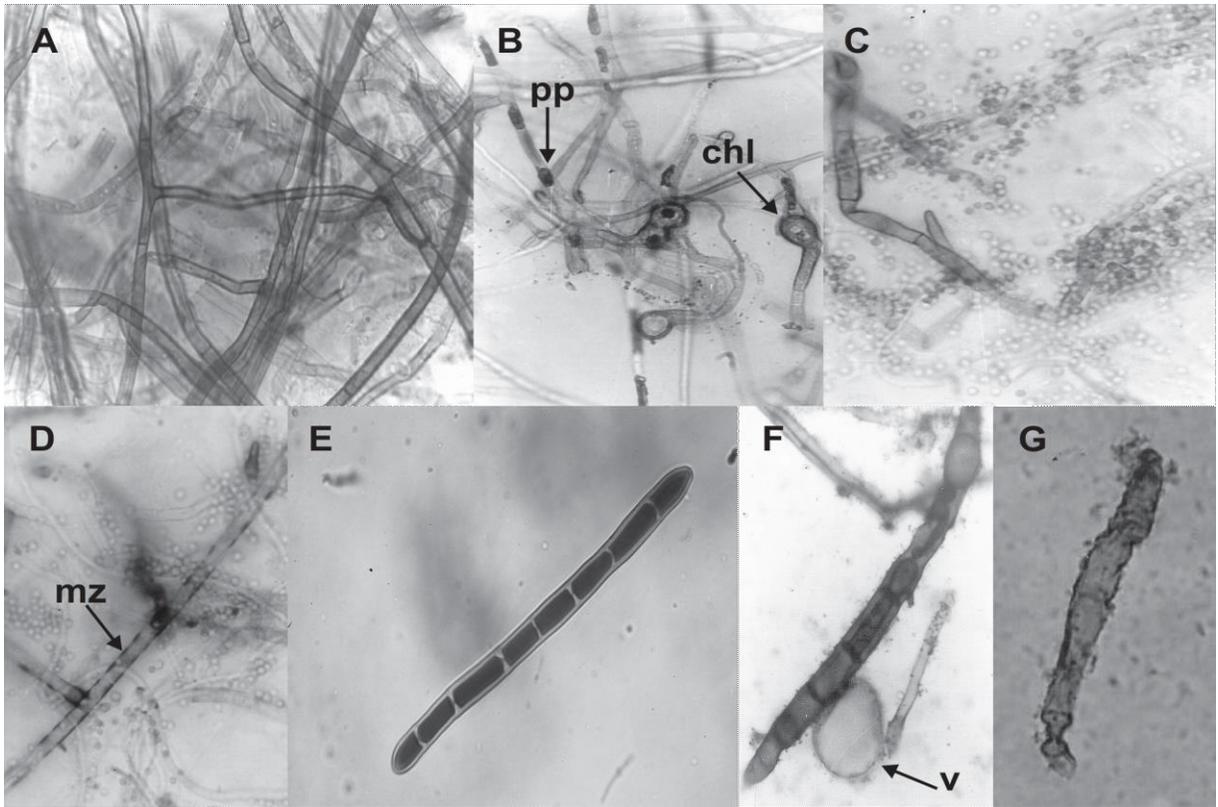


Figura 33. Alteraciones de hifas y conidios de *P. tritici-repentis* en presencia de los endófitos en cultivos duales.

(A) micelio normal de *Ptr* (control); (B) formación de clamidosporas (chl) y precipitados pigmentados dentro del micelio (pp) (*Ptr/Penicillium* sp.); (C) plasmólisis de hifas (*Ptr/Trichoderma hamatum*); (D) zonas de melanización (mz) (*Ptr/T. hamatum*); (E) conidio normal de *Ptr*; (F) tubo germinativo corto y ampollado (formación de vesículas) (v) (*Ptr/Bacillus* sp.); (G) plasmólisis conidial (*Ptr/Penicillium* sp.). (400 X).

Asimismo, en las colonias de *Ptr* pudo observarse en presencia de *Bacillus* sp. el desplazamiento del micelio de *Ptr* en dirección opuesta al endófito (Figura 32D); en presencia de *C. globosum*, crecimiento de aspecto achaparrado y pigmentación anaranjada en la zona de interacción (Figura 34A); en presencia de *Penicillium* sp., pigmentación de coloración rojizo-anaranjado (Figura 34B) y en presencia de *T. hamatum*, pigmentación anaranjada en la zona de interacción (Figura 34C). Por el contrario, ninguna de las alteraciones mencionadas fue observada en el medio de cultivo o en las colonias del tratamiento control.

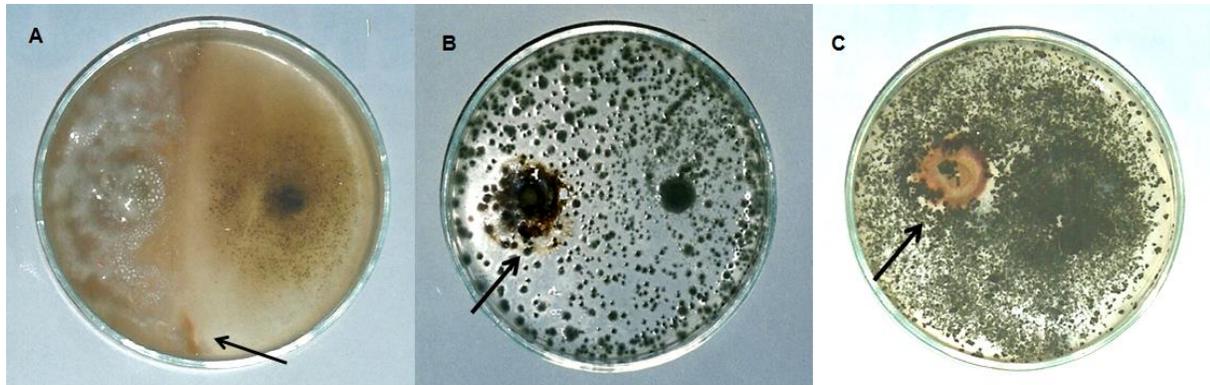


Figura 34. Pigmentación en las zonas de interacción *P. tritici-repentis*-endófitos.

(A) interacción *Ptr-C. globosum*; (B) interacción *Ptr-Penicillium* sp.; (C) interacción *Ptr-T. hamatum*.

3.2.2. Germinación de esporas

Los resultados del ensayo realizado para evaluar la habilidad de los endófitos en la inhibición de la germinación de las esporas de *Ptr* utilizando la técnica de las suspensiones pareadas mostraron que hubo diferencias significativas entre los endófitos (Tabla 24).

Tabla 24. ANAVA de la germinación de esporas de *P. tritici-repentis* en suspensiones pareadas con endófitos

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Endófitos	9	6.67	≤0.001
Error	15	0.34	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Entre los endófitos se destacaron *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp., quienes redujeron 82% y 52% la germinación de los conidios de *Ptr*, respectivamente en comparación con el control (Figura 35).

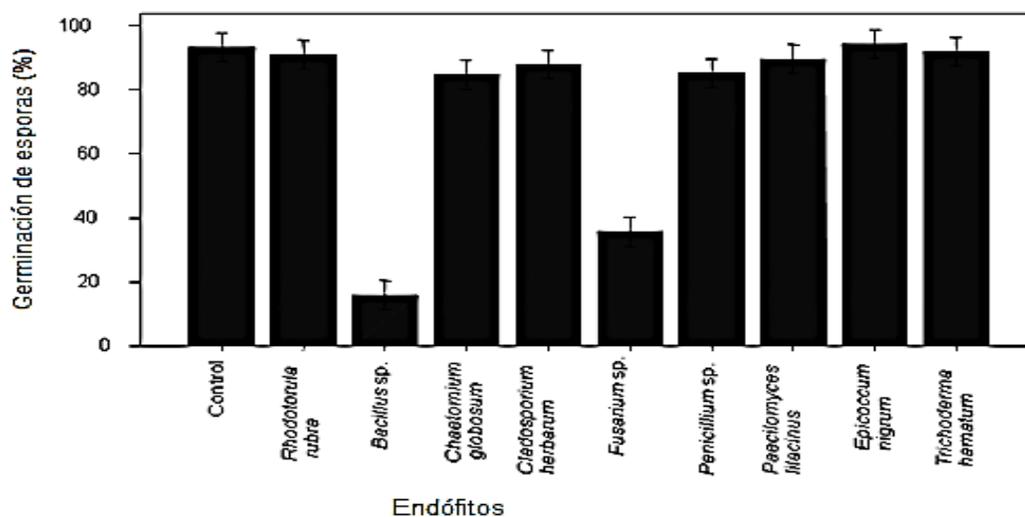


Figura 35. Porcentaje de germinación de esporas de *P. tritici-repentis* en suspensiones pareadas con endófitos.

3.3. Prueba en condiciones semicontroladas *in vivo*.

A los 13 días de realizada la pre-inoculación de los endófitos y 12 días de la inoculación con *Ptr* en plántulas de trigo se realizó la evaluación de la severidad de la mancha amarilla para los distintos tratamientos en las tres hojas inoculadas (Figura 36). El ANAVA mostró diferencias significativas entre los endófitos en la severidad de la enfermedad en la primera, segunda y tercera hoja y para el promedio de las mismas. Asimismo, los experimentos mostraron diferencias significativas para la primera hoja y el promedio (Tabla 25).

Tabla 25. ANAVA del efecto de la inoculación de endófitos en plántulas de trigo en la reducción de la severidad de la mancha amarilla.

Fuente de variación	Grados de libertad	Primera hoja		Segunda hoja		Tercera hoja		Promedio	
		Cuadrado medio	P<F						
Experimentos	1	0.116	0.020	0.002	0.680	0.000	0.846	0.015	0.039
Endófitos	9	0.142	<0.001	0.072	<0.001	0.016	<0.001	0.044	<0.001
Experimentos × endófitos	9	0.017	0.607	0.013	0.253	0.003	0.203	0.003	0.449
Error	7 4	0.021		0.010		0.002		0.003	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Como puede observarse, la mayoría de los endófitos mostró capacidad para reducir la severidad de la mancha amarilla, excepto *R. rubra* que solo fue efectiva en la tercera hoja y *Penicillium* sp. que no redujo la sintomatología en la segunda hoja. *T. hamatum*, *C. globosum* y *Fusarium* sp. fueron los endófitos que redujeron significativamente ($P \leq 0.05$) la severidad de la enfermedad en las tres hojas comparadas con el control destacándose particularmente el efecto de *T. hamatum* (Tabla 26).



Figura 36. Ensayo en invernáculo para evaluación del efecto de los endófitos en la reducción de la severidad de la mancha amarilla del trigo.

Tabla 26. Medias del efecto de los endófitos en la severidad de la mancha amarilla en tres hojas de plántulas de trigo

Endophytes	Primera hoja	Segunda hoja	Tercera hoja	Promedio
<i>Bacillus</i> sp.	74.01 c*	14.58 bcd	0.76 abcd	29.78 c
<i>Chaetomium globosum</i>	54.32 b	10.93 ab	0.36 abc	21.87 b
<i>Cladosporium herbarum</i>	69.34 bc	19.10 cde	1.61 def	30.02 c
<i>Epicoccum nigrum</i>	69.29 bc	22.87 e	0.99 bcde	31.05 c
<i>Fusarium</i> sp.	59.74 b	10.94 ab	0.34 ab	23.67 b
<i>Penicillium</i> sp.	70.36 cd	24.59 e	1.67 ef	32.21 c
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	68.60 bc	11.88 abc	0.25 a	26.91 bc
<i>Rhodotorula rubra</i>	74.92 c	23.90 e	1.07 bcde	33.30 c
<i>Trichoderma hamatum</i>	38.89 a	7.27 a	0.20 a	15.46 a
Control (<i>Ptr</i>)	74.45 c	21.55 de	2.67 f	32.89 c

*Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no difieren estadísticamente. Test de F ($P \leq 0.05$).

4. Discusión

En nuestro país, el control biológico es considerado una opción atractiva para el manejo integrado de enfermedades de plantas en el marco de una agricultura sustentable. Diversos autores han demostrado el potencial de la microbiota del filoplano de trigo en el biocontrol de hongos patógenos de importancia en el cultivo de trigo y frente a *Ptr* (Perelló *et al.*, 2001; 2003; 2006; 2009; Perelló y Mónaco, 2007).

De acuerdo a lo sugerido por diferentes investigadores algunos endófitos ocupan el mismo nicho ecológico que los patógenos, por lo cual podrían interactuar entre ellos. Por ejemplo, generando una competencia por el sitio de infección a través de la producción de metabolitos secundarios, contribuyendo a un antagonismo directo del endófito frente al patógeno. En este sentido, los endófitos podrían ser una alternativa promisoría en el control biológico de patógenos, existiendo registros de antagonismo *in planta* como la presencia de endófitos en hojas de cacao que fue asociada a la reducción de la enfermedad causada por *Phytophthora* (Petrini *et al.*, 1992; Dingle y McGee, 2003; Istifadah y McGee, 2006; Arnold *et al.*, 2003; Arnold, 2007). Asimismo, otros investigadores sugirieron que los endófitos aislados de un determinado órgano estarían adaptados a las condiciones microecológicas y fisiológicas presentes en ese órgano y por lo tanto podrían tener un efecto antagonista frente a patógenos, protegiendo a su hospedante (Fisher *et al.*, 1991). En este sentido, los endófitos utilizados en los ensayos realizados en las pruebas *in vitro* e *in vivo* frente *Ptr*, causante de manchas foliares, fueron aislados preliminarmente de hojas de trigo, por lo cual, y de acuerdo a los resultados obtenidos aquí lo sugerido por Fisher *et al.* (1991) podría asumirse como válido.

Todos los endófitos excepto *R. rubra* para uno de los tiempos de evaluación, redujeron el crecimiento de *Ptr* en los cultivos duales, sin embargo se destacaron *T. hamatum*, *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. y *P. lilacinus*. *Bacillus* antagonizó al patógeno en los ensayos *in vitro*, mientras que levemente redujo la severidad de la mancha amarilla en el bioensayo de invernáculo. Diferentes especies endófitas pertenecientes al género *Bacillus* han sido mencionadas como promisorios agentes de biocontrol, entre ellas, *B. mojavensis* con potencial para controlar la infección de *F. verticillioides* y reducir el contenido de fumonisinas en maíz (Alippi *et al.*, 2000; Kloepper *et al.*, 2004; Bacon y Hinton, 2011). Cepas endofíticas de *B. subtilis* obtenidas de plantas de trigo mostraron alta actividad antifúngica frente a *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, agente causal del pietín y frente a *Blumeria graminis* (DC.) Speer f.sp. *tritici* Marchal, causante del oídio de los cereales (Liu *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2015). Para este último patógeno las examinaciones microscópicas luego de los tratamientos demostraron que *B. subtilis* redujo

la germinación de esporas y causó deformación y ruptura de los tubos germinativos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en el presente trabajo en los que *Bacillus* sp. ocasionó la mayor reducción en el porcentaje de germinación de las esporas de *Ptr*, plasmólisis conidial, deformaciones de los tubos germinativos así como vacuolación de hifas, mecanismos que forman parte del micoparasitismo en el biocontrol. Asimismo, podría sugerirse la posible producción de sustancias antibióticas de acuerdo a lo observado en la disposición del crecimiento de la colonia de *Ptr* al enfrentarse en cultivos duales con el endófito *Bacillus* sp. (Fig. 32D). En este sentido, cabe mencionar que se ha reportado la producción por especies de éste género de diversos metabolitos de importancia industrial para el desarrollo de fungicidas naturales tales como las surfactinas (Bacon y Hinton, 2011).

Por su parte, los endófitos *Fusarium* sp. y *C. globosum* además de ocasionar una reducción en el porcentaje de germinación de las esporas de *Ptr*, siendo mayor el efecto de *Fusarium*, alteraron la morfología conidial y redujeron significativamente la severidad de la mancha amarilla en el bioensayo *in vivo*. En los cultivos duales con *T. hamatum*, *Bacillus* sp., *C. globosum*, *P. lilacinum* y *Penicillium* sp. a su vez, se observó la pigmentación de hifas del patógeno o formación de precipitados pigmentados. *Bacillus* sp., *Penicillium* sp. y *P. lilacinum* produjeron plasmólisis, formación de clamidosporas y alteración conidial, mientras que en cultivos duales con *T. hamatum* se observaron zonas de melanización en las paredes de las hifas así como plasmólisis. Alteraciones como la formación de compuestos pigmentados, vacuolación y granulación de hifas de *Ptr* frente a *P. lilacinum*, aislado del filoplano, fueron reportadas por Perelló y Mónaco (2007) en pruebas en cultivos duales.

Diferentes especies de *Trichoderma* han sido probadas exitosamente como agentes de biocontrol de fitopatógenos (Monte, 2001; Stocco, 2014). Por ejemplo, pueden mencionarse a *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. koningii*, aisladas del filoplano del trigo, que mostraron inhibición del crecimiento micelial, plasmólisis de hifas y conidios de *Ptr* (Perelló *et al.*, 2003; 2006), así como reducción de la severidad de la mancha amarilla en ensayos en condiciones de campo (Perelló *et al.*, 2006; Perelló y Mónaco, 2007; Perelló y Dal Bello, 2011). Asimismo, especies endófitas de *Trichoderma* han mostrado efecto antagonista frente a enfermedades de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Bailey *et al.*, 2008) y frente al marchitamiento por *Fusarium* de la lenteja (Dolatbadi *et al.*, 2012).

En los cultivos duales *Ptr-T. hamatum*, ambos crecieron pero luego el patógeno se detuvo rodeando al endófito y en la zona de interacción de ambas colonias se observó plasmólisis de hifas y conidios, por lo cual podría sugerirse que el mecanismo utilizado por el endófito para el antagonismo podría implicar mecanismos de competencia por

espacio/nutrientes y el micoparasitismo. En este sentido, ha sido demostrado que uno de los principales mecanismos utilizados por especies del género *Trichoderma* en su acción biocontroladora es el micoparasitismo tal como lo demostrado para *T. virens* en su efecto frente a *Rhizoctonia solani* (Howell, 2003; Stocco, 2014). Asimismo, cabe mencionar que según Howell (2003) la ubicuidad de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo y su capacidad de crecer en sustratos tales como madera en descomposición, y otras formas de materia orgánica vegetal, es una prueba de que es un buen competidor por espacio y nutrientes.

Chaetomiun es otro género de endófitos que ha sido reportado previamente inhibiendo el crecimiento de *Ptr* en ensayos realizados *in vitro* e *in planta* por diferentes autores (Istifadah *et al.*, 2006; Istifadah y McGee, 2006). En los ensayos realizados en el presente trabajo *C. globosum* produjo plasmólisis de los conidios de *Ptr*, formación de pigmentos anaranjados amarronados en la zona adyacente al endófito, así como la reducción del desarrollo de la mancha amarilla en las pruebas *in vivo*.

Los aislamientos endofíticos *Penicillium* sp. y *P. lilacinus*, que mostraron en los ensayos *in vitro*, buen potencial frente a *Ptr*, aislados del filoplano de trigo fueron citados por otros autores como eficientes antagonistas frente a importantes fitopatógenos foliares del trigo en Argentina (Perelló y Mónaco, 2007).

Además del efecto de los hongos filamentosos y de la bacteria, la levadura endófito *R. rubra*, cosmopolita en aire, suelo y plantas (Gyaurgieva *et al.*, 1996) ha sido estudiada por su capacidad como agente de biocontrol frente a *Ptr*. Esta levadura fue previamente aislada del filoplano de trigo por Perelló y Mónaco (2007) quienes demostraron su buen efecto en el biocontrol del complejo de enfermedades foliares del trigo (*Z. tritici*, *B. sorokiniana*, *Ptr* y *A. triticimaculans*). Interesantemente, en este trabajo, en las pruebas de antagonismo realizadas *R. rubra* ocasionó alteraciones de los conidios de *Ptr* en las suspensiones pareadas endófito-patógeno *in vitro* y una significativa reducción de la severidad de la mancha amarilla del trigo, si bien solo en las hojas jóvenes, en el ensayo realizado en invernáculo. En este sentido, cabe destacar que en este ensayo, en las hojas jóvenes hubo más endófitos que redujeron el patógeno, lo que podría explicarse por una menor severidad observada de la enfermedad en esas hojas.

5. Conclusiones

El efecto antagonista de los endófitos aislados de trigo probados frente a *Ptr* en los ensayos *in vitro* fue también observado en las pruebas *in planta*. Los endófitos de trigo evaluados mostraron capacidad antagónica frente a *Ptr* en las pruebas *in vitro*, ocasionando la reducción del crecimiento del patógeno y/o la reducción de la severidad de la mancha amarilla al estado de plántula en la prueba *in vivo*, destacándose en particular el efecto de *T. hamatum* y *Bacillus* sp.

De acuerdo a estos resultados se destaca la efectividad de *T. hamatum* que mostró el mayor efecto antagónico frente al patógeno en los cultivos duales, ocasionó alteraciones de hifas y conidios de *Ptr* y fue efectivo en la reducción de la severidad de la mancha amarilla en las prueba realizada en invernáculo. A su vez, puede destacarse el efecto de *Bacillus* sp. que antagonizó al patógeno en los ensayos *in vitro* principalmente. Un efecto menos marcado fue registrado por *C. globosum* y *Penicillium* sp. en todos los ensayos realizados.

Por lo mencionado, *T. hamatum* y *Bacillus* sp. podrían ser considerados buenos candidatos para profundizar su estudio como agentes biocontroladores de la mancha amarilla del trigo y a fines de dilucidar los mecanismos involucrados en la acción antagónica frente a *Ptr*.

**CAPITULO IV: ANTAGONISMO DE LA
MICROBIOTA ENDOFITICA DE LA SOJA FRENTE A
*Macrophomina phaseolina***

1. Antecedentes

Frente al nuevo paradigma de los sistemas agrícolas mundiales, enfocados en una producción sustentable y amigable con el ambiente, la búsqueda de alternativas inocuas para el control de fitopatógenos es un desafío actual. La podredumbre carbonosa es una enfermedad económicamente importante en diferentes países del mundo y en nuestro país, en donde puede llegar a ser limitante de la producción sojera, en particular en zonas marginales de cultivo, donde se ha establecido en las últimas décadas y en las que es frecuente que las plantas de soja sufran estrés hídrico.

De acuerdo a algunos investigadores, el principal factor que influencia el crecimiento y la sanidad de las plantas es la población microbiana que habita en la rizosfera y en el interior de los tejidos de las plantas (Porras-Alfaro y Bayman, 2011; Dalal y Kulkarni, 2014b). Diversos autores han sugerido que ciertos endófitos ocupan el mismo nicho ecológico que los patógenos siendo posible la interacción entre ellos, por lo cual deberían ser considerados como potenciales agentes de control biológico (Petrini *et al.*, 1992; Dingle y McGee, 2003; Istifadah y McGee, 2006; Arnold, 2007).

Existe muy escasa evidencia del empleo de endófitos fúngicos como agentes de biocontrol frente a patógenos de la soja. Entre ellos, pueden mencionarse los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* utilizando diferentes especies endófitas aisladas de soja frente a *Diaporthe phaseolorum*, agente causal del tizón de la vaina y del tallo y de la podredumbre de la semilla y *Sclerotinia sclerotiorum*, causante de la podredumbre del tallo, en los que se obtuvo la reducción del crecimiento de ambos patógenos (Impulliti, 2012). Otras experiencias realizadas *in planta*, demostraron que los endófitos *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp., aislados de plantas de soja redujeron la podredumbre de la raíz y tallo ocasionada por *Rhizoctonia solani* (Dalal y Kulkarni, 2015). Rodríguez *et al.* (2008) evaluaron 5 cepas de hongos endófitos radiculares septados oscuros (DSE), aislados de raíces de soja, frente a *M. phaseolina* (MP) registrando efectos inhibitorios sobre el crecimiento del patógeno y corroborando también la actividad antifúngica en exudados de las cepas testeadas. Recientemente, en India, Dalal y Kulkarni (2014b) evaluaron la capacidad antagónica *in vitro* de endófitos actinomicetes aislados de órganos aéreos de soja, tales como *Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp., *Nocardia* sp., *Actinomadura* sp., *Microbispora* sp. y *Actinoplanes* sp. frente a *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Collectotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore, *Macrophomina phaseolina* y *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. obteniendo una reducción de las colonias de los patógenos, si bien con muy baja efectividad frente a MP.

Resultados similares obtuvieron Dalal *et al.* (2014) en investigaciones realizadas *in vitro*, en cultivos duales, con especies endófitas aisladas de soja pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Cladosporium* frente a los mismos patógenos. En estos experimentos, los resultados también mostraron valores bajos de reducción del crecimiento de *MP* (entre un 4 y 11%) destacándose dos aislamientos de *Aspergillus* sp., uno de *Alternaria* sp. y uno de *Fusarium* sp.

Considerando, que el manejo de *MP* es dificultoso por varias razones, entre ellas puede mencionarse por ser un patógeno polífago, habitante natural del suelo con una amplia variabilidad morfológica, por no disponerse de fungicidas efectivos para su control así como tampoco niveles adecuados de resistencia genética. Por lo cual, surge la necesidad de encontrar otras alternativas para su manejo en el marco de una agricultura sustentable.

Debido a que en nuestro país no existen antecedentes en el estudio de los endófitos en el biocontrol de *MP* el objetivo del presente capítulo fue evaluar la capacidad antagonista potencial de especies endófitas, aisladas previamente de plantas de soja de nuestra región productora, frente a *M. phaseolina*.

2. Materiales y métodos

A partir de las colecciones de los endófitos aislados de soja en este trabajo, preliminarmente, se realizó la selección de las especies fúngicas a evaluar como potenciales antagonistas utilizando como criterios que no sean especies de conocidos patógenos y que hayan sido aislados con frecuencias altas (ej. *Penicillium* sp. 1). Se seleccionaron los siguientes endófitos: *Trichoderma koningii*, 3 aislamientos de *T. harzianum* (estadios V5, R4 y R6), *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, 2 aislamientos de *T. longibrachiatum* (estadio R6: nombradas como R6-1 y R6-2), *Aspergillus* sp. 1, *A. niger* y 2 aislamientos de *Penicillium* sp. (nombrados como *Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2). Los endófitos fueron mantenidos en medio de cultivo APG al 2% y refrigerados entre 2 y 6°C hasta su utilización.

2.1. Pruebas de patogenicidad

A fines de corroborar que las especies endófitas seleccionadas no fueran patógenas se diseñó un ensayo en condiciones semicontraídas en invernáculo. Para la realización de las

pruebas de patogenicidad se sembraron semillas de soja del cultivar DM 3810 (Don Mario) en bandejas multimacetas conteniendo una mezcla de tierra, arena y perlita (50:35:15), previamente tinalizada en autoclave, las que fueron mantenidas en invernáculo. Los endófitos *Trichoderma koningii*, los 3 aislamientos de *T. harzianum* (V5, R4 y R6), *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, los 2 aislamientos de *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2), *Aspergillus* sp. 1, *A. niger*, *Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2 fueron sembrados en placas de Petri conteniendo APG al 2% e incubados en estufa a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad durante 7 días para multiplicación del inóculo.

A los 25 días de germinadas, 25 plántulas fueron inoculadas con cada una de las suspensiones de los endófitos por aspersión hasta chorreo. El inóculo empleado consistió en suspensiones de conidios en agua destilada estéril, elaboradas a partir de las colonias desarrolladas en APG al 2% y ajustadas con hematocitómetro de Neubauer a una concentración de 10^6 conidios/ml. Los testigos fueron asperjados solo con agua destilada estéril. A continuación de la inoculación, las plántulas de todos los tratamientos se cubrieron con bolsas de nylon a los efectos de realizar una cámara húmeda durante 48 h, luego, se mantuvieron en condiciones de invernáculo ($25-30/14-16^\circ\text{C}$, día y noche respectivamente) durante 25 días para corroborar que los endófitos evaluados no ocasionaran síntomas que podrían indicar su patogenicidad.

2.2. Bioensayo de antagonismo frente a *M. phaseolina* in vitro

2.2.1. Cultivos duales

La cepa de *MP* utilizada en los ensayos fue gentilmente proporcionada por la Dra. M.M. Scandiani del Laboratorio Agrícola Río Paraná, Red Nacional de Protección Vegetal (RedNPV) del Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA). El patógeno se multiplicó sembrándolo en cajas de Petri conteniendo APG al 2% y se incubó a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en estufa en condiciones de oscuridad durante 4 días.

Los endófitos seleccionados en la prueba anterior (endófitos no patógenos) *T. koningii*, los 3 aislamientos de *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, los 2 aislamientos de *T. longibrachiatum*, *Aspergillus* sp. 1, *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2 fueron analizados por su capacidad antagónica frente a *MP* a través de la evaluación de la inhibición del crecimiento del patógeno y la examinación microscópica de la zona de interferencia hifal utilizando la técnica de cultivos duales.

Se emplearon cajas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 10 ml de APG al 2% en las que sembraron enfrentados en cultivos dobles discos de 6 mm de diámetro de los hongos endófitos y de *MP*, extraídos con sacabocados a partir de la sección periférica de colonias de 7 y 4 días crecidas en APG al 2% respectivamente. Los discos fueron ubicados a 4 cm de distancia sembrándose simultáneamente y luego fueron incubados en estufa en condiciones de oscuridad a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los testigos consistieron en la siembra de discos de *MP* en APG al 2%. Se realizaron 5 repeticiones de cada tratamiento y el ensayo se repitió 2 veces. A los 3 días de la siembra, tiempo en que los testigos cubrieron casi toda la placa, se realizó la medición del diámetro de las colonias del patógeno (cm) en dirección al endófito.

Análisis estadístico

El ensayo fue analizado mediante un ANAVA para diseño factorial en bloques al azar considerando como factores para los diámetros de las colonias los experimentos y los endófitos. Las medias fueron comparadas con el test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat Release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

Respuesta antagónica en la zona de interacción patógeno–antagonista

Los tipos de interacciones se evaluaron de acuerdo a las observaciones realizadas por Porter (1924) y Dickinson y Boardman (1971) a los 14 días de la siembra. Con la finalidad de observar alteraciones de hifas de *MP* se tomaron 3 secciones de la zona de contacto o interferencia entre las colonias de cada tratamiento patógeno-endófito y de los márgenes de las colonias del testigo, observándose al microscopio óptico (200 y 400X).

2.2.2. Bioensayos en semillas de soja peleteadas con endófitos en medio colonizado por *M. phaseolina*

El objetivo de este bioensayo fue evaluar el potencial de las diferentes especies endófitas de *Trichoderma*, aisladas de plantas asintomáticas de soja y previamente seleccionadas y probadas por su patogenicidad, como bioprotectores de semillas de soja frente a *MP*. Se utilizaron como potenciales antagonistas a los siguientes endófitos: *T. koningii*, los tres aislamientos de *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii* y los 2 aislamientos de *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2).

Multiplicación del patógeno (MP)

El patógeno se sembró en cajas de Petri estériles conteniendo APG al 2% para su multiplicación. En ellas, se sembraron discos de 5 mm de diámetro en el centro de cada una de las cajas de 90 mm y se colocaron en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad durante 4 días (tiempo de cobertura total de la placa de Petri).

Multiplicación de los endófitos

Los hongos endófitos se multiplicaron en cajas de Petri conteniendo APG al 2% y se incubaron en estufa a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad durante 7-15 días.

Peleteado de semillas

Para el bioensayo se utilizaron semillas de soja del cultivar DM 3810 (Don Mario) a las que se le determinó el poder germinativo previamente con resultados de 98% para los 7 días y de 100% para los 9 días. Se separaron 35 semillas para cada uno de los tratamientos y se inocularon artificialmente siguiendo la técnica descrita por Cordo *et al.* (2007). El recubrimiento fue preparado a partir de las colonias de los endófitos desarrolladas en APG al 2% a las que se les agregó agua estéril realizando un raspado para la extracción de los conidios. Luego, las suspensiones de cada endófito fueron filtradas y estandarizadas a concentraciones de 10^7 conidios/ml con hematocitómetro de Neubauer, adicionándose 0.05% (v/v) de Tween 20. De cada suspensión se tomaron 2 ml, se adicionaron 18 ml de agar agua esterilizado en autoclave al $2/_{00}$, colocándose en vasos de precipitación de 100 ml junto con las semillas de soja asintomáticas en agitador magnético durante 20 minutos. A continuación, se filtraron las semillas peleteadas de cada tratamiento con colador y se dejaron secar en cámara de flujo laminar durante 12 h sobre papel tissue (Perelló *et al.*, 2006). Las semillas que fueron utilizadas como testigos fueron peleteadas solo con agar agua al $2/_{00}$. Luego de oreadas y secas, las semillas peleteadas fueron utilizadas para el ensayo colocándose directamente en las cajas de Petri colonizadas por *MP* de acuerdo a los siguientes tratamientos: T1: semillas con *T. koningii*; T2: semillas con *T. harzianum* (aislado en V5); T3: semillas con *T. harzianum* (aislado en R4); T4: semillas con *T. harzianum* (aislado en R6); T5: semillas con *T. aureoviride*; T6: semillas con *T. pseudokoningii*; T7: semillas con *T. longibrachiatum* (aislado en R6-1); T8: semillas con *T. longibrachiatum* (aislado en R6-2), y dos testigos: T9: (testigo enfermo): semillas con agar agua sembradas en medio colonizado por *MP* y T10: (testigo sano) semillas con agar agua sembradas en medio APG al 2% (Figura 37). En cada placa de Petri se colocaron seis semillas,

incubándose a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con 12 h de luz y 12 horas de oscuridad durante seis días. Se realizaron cinco repeticiones para cada uno de los tratamientos.

La evaluación consistió en el registro del daño causado por el patógeno en los distintos tratamientos para lo cual se realizó el recuento de semillas germinadas y se midió el largo de las radículas.

Análisis estadístico

Los datos fueron registrados y procesados mediante un ANAVA con los 10 tratamientos y 5 repeticiones, comparando las medias mediante el Test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$).

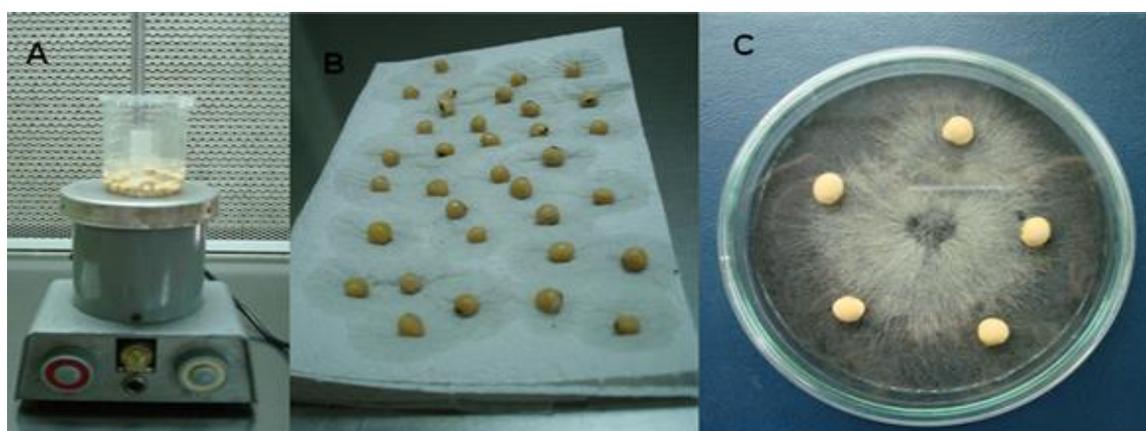


Figura 37. Peleteado y siembra de semillas de soja en medio colonizado por *M. phaseolina*.

(A) Semillas en agar agua y suspensión de inóculo en agitación magnética; (B) secado de semillas peleteadas en cámara de flujo laminar; (C) semillas sembradas sobre la colonia de *MP*.

2.3. Bioensayo de antagonismo frente a *M. phaseolina* in vivo

El objetivo del ensayo fue evaluar el efecto bioprotector de los endófitos analizados en la prueba anterior: *T. koningii*, 3 aislamientos de *T. harzianum* (aislados en V5, R4 y R6), *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii* y 2 aislamientos de *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2) frente a *MP* en la germinación de semillas y en plántulas de soja creciendo en sustrato inoculado artificialmente. La metodología siguió los siguientes pasos:

Multiplicación del patógeno

La multiplicación del inóculo se realizó en arroz blanco pulido y lavado en agua corriente. Para ello, se colocaron 10 gramos de arroz en cajas de Petri de 90 mm adicionando 10 ml de agua destilada (1:1) y luego se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atm. Luego se sembró el patógeno colocando discos de 1 cm de diámetro, obtenidos de los márgenes de colonias de 4 días desarrolladas en APG al 2%, sobre el arroz estéril, incubándose en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 días en condiciones de oscuridad (Abawi y Pastor Corrales, 1990). Pasado ese tiempo, el arroz colonizado por el patógeno se dejó orear en cámara de flujo laminar durante 1 día para lograr eliminar el exceso de humedad y para facilitar el macerado posterior. Con la ayuda de un mortero se molió y se esparció sobre papel tissue para su total secado para lo cual se llevó a estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Luego, se realizó una nueva molienda con molinillo eléctrico hasta obtener un polvo fino de color negro (Castellanos *et al.*, 2013) (Figura 38).

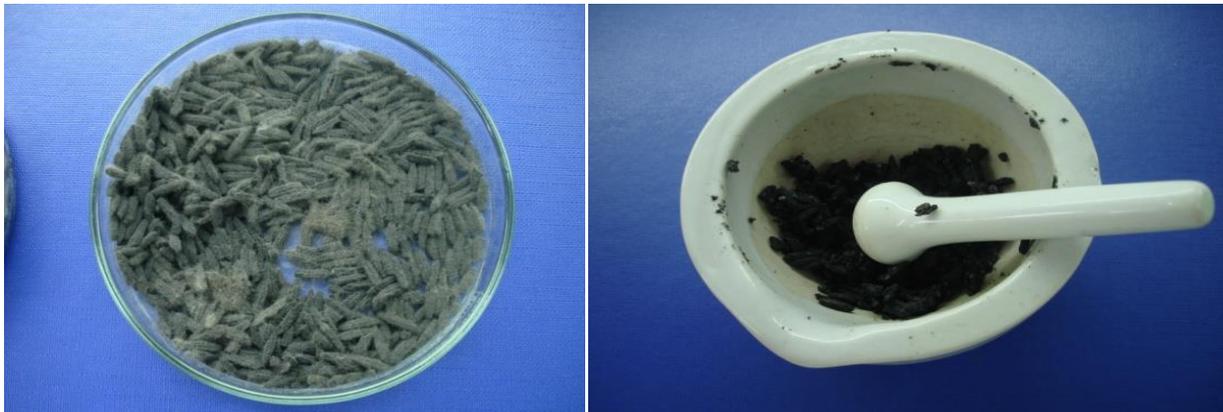


Figura 38. Preparación del inóculo de *M. phaseolina*.

A continuación se estimó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) capaces de desarrollar en APG al 2% a partir de 1 g de inóculo utilizando la técnica de las suspensiones sucesivas (Waksman, 1927). Para ello, en cámara de flujo laminar, a 1 g de inóculo se le adicionaron 10 ml de agua estéril, realizándose luego diluciones seriadas extrayendo con micropipeta 1 ml y adicionando 9 ml de agua estéril. Se realizaron un total de 8 diluciones a fines de obtener una suspensión que permita el recuento de colonias. De cada una de las diluciones obtenidas, se tomó 1ml y se colocó en cajas de Petri conteniendo APG al 2% adicionado de cloranfenicol (250 mg/l). Se realizaron 4 repeticiones de cada dilución. Las placas

se incubaron en estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días, realizándose un seguimiento diario. Luego, se contaron las colonias de *MP* desarrolladas y fueron transformadas a UFC/g de inóculo. Las diluciones utilizadas para la determinación del número de colonias fueron 10^{-4} y 10^{-5} que dieron valores entre 90.000 y 110.000 UFC/g de inóculo.

Preparación del sustrato

El sustrato para el ensayo consistió de una mezcla de tierra estéril, arena y perlita en una proporción de 50:35:15. Esta preparación fue previamente tinalizada en autoclave, en bolsas de nylon a $80-100^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, repitiéndose 3 veces y luego se guardó asépticamente hasta su utilización.

Multiplicación de los endófitos

Los hongos endófitos se multiplicaron en cajas de Petri conteniendo APG al 2% y se incubaron en estufa a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad durante 7-15 días.

Peleteado de semillas

Para este bioensayo se utilizaron las mismas semillas de soja que en las pruebas *in vitro* (cultivar DM 3810) ya evaluadas por su poder germinativo. A su vez, la preparación de las suspensiones de los endófitos y el peleteado de las semillas se realizaron utilizando las mismas técnicas que en el ensayo anterior. Luego, las semillas peleteadas fueron utilizadas para la siembra directamente. Las semillas que fueron utilizadas como tratamientos testigo fueron peleteadas con agar agua al 2/00.

Siembra de semillas de soja

El sustrato estéril se colocó en bandejas multimacetas (speeldings) de 50 celdas de 9 cm x 5 cm cada una. El ensayo fue diseñado con un total de 10 tratamientos y 4 repeticiones de 5 unidades cada uno y, fueron los siguientes: T1: semillas de soja peleteadas con *T. koningii*; T2: semillas de soja peleteadas con *T. harzianum* (V5); T3: semillas de soja peleteadas con *T. harzianum* (R4); T4: semillas de soja peleteadas con *T. harzianum* (R6); T5: semillas de soja peleteadas con *T. aureoviride*; T6: semillas de soja peleteadas con *T. pseudokoningii*; T7: semillas de soja peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-1); T8: semillas de soja peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-2); T9: testigo enfermo: semillas de soja peleteadas con agar agua en suelo inoculado con *MP*; T10: testigo sano: semillas de soja peleteadas con agar agua en suelo sin inoculación con *MP*.

La inoculación del sustrato para todos los tratamientos, excluyendo el T10, se realizó incorporando 0.1 g de inóculo de *MP* (entre 9000 y 11000 UFC) junto a la semilla en el mismo momento de la siembra. Esta concentración fue preliminarmente probada en varios ensayos y puesta a punto para su utilización.

El ensayo fue regado artificialmente manteniendo un nivel de humedad menor al óptimo a fines de proporcionar las condiciones adecuadas para el desarrollo del patógeno. Durante el ensayo las temperaturas medias fueron entre 25-30/12-15°C (día/noche). Se realizó una primera evaluación a los 15 días de la siembra haciendo el recuento de semillas germinadas (expresando los resultados en porcentaje) y a los 21 días, se extrajeron las plántulas a fines de la evaluación final de las partes aéreas y subterráneas. La evaluación consistió en la observación visual de la presencia de lesiones hundidas castaño-rojizas en epi e hipocótilos, en cotiledones, plántulas débiles, estrangulamiento de tallos, necrosis radicular, muerte de plántulas, síntomas característicos de la podredumbre carbonosa.

Análisis estadístico

Con los datos registrados se realizó un ANAVA de un diseño enteramente al azar con 10 tratamientos y 4 repeticiones con 5 unidades cada uno. Las medias fueron comparadas mediante el Test de Fisher (LSD) ($P \leq 0.05$). Se utilizó el programa Genstat release 12.1 (The Null Corporation, 2009).

3. Resultados

3.1. Pruebas de patogenicidad

Los resultados de los test de patogenicidad mostraron que ninguno de los endófitos inoculados en plántulas de soja (*Trichoderma koningii*, los 3 aislamientos de *T. harzianum* (V5, R4 y R6), *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, los 2 aislamientos de *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2), *Aspergillus* sp. 1, *A. niger*, *Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2) ocasionó síntomas de enfermedad. Por lo cual, estos endófitos fueron utilizados para su evaluación como agentes biocontroladores frente a *MP*.



Figura 39. Plántulas de soja creciendo en invernáculo.

3.2. Bioensayo de antagonismo frente a *M. phaseolina in vitro*

3.2.1. Cultivos duales

Los resultados obtenidos al enfrentar los endófitos con *MP* en cultivos duales mostraron que hubo diferencias significativas entre los experimentos y entre los endófitos, con respecto al crecimiento de las colonias del patógeno, sin embargo no hubo diferencias en la interacción experimentos \times endófitos, como puede observarse en la Tabla 27.

Tabla 27. ANAVA del diámetro de crecimiento de *M. phaseolina* en cultivos duales con doce endófitos en comparación con el testigo

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*
Experimentos	1	2.806	≤ 0.001
Endófitos	12	17.644	≤ 0.001
Experimentos \times endófitos	12	0.197	0.1794
Error	100	0.141	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Todos los endófitos evaluados redujeron el diámetro de las colonias de *MP* en los cultivos duales en comparación con el testigo, destacándose el efecto de *T. aureoviride*, *T.*

harzianum (R4), *T. koningii*, *T. longibrachiatum* (R6-1), *T. harzianum* (V5), *T. pseudokoningii*, *T. harzianum* (R6) y *T. longibrachiatum* (R6-2), como puede verse en la siguiente tabla (Tabla 28).

Tabla 28. Medias de los diámetros de crecimiento de las colonias de *M. phaseolina* en cultivos duales con 12 endófitos en dos experimentos

Endófitos	Medias del crecimiento de las colonias de <i>MP</i> (cm)
<i>Aspergillus niger</i>	5.17 d*
<i>Aspergillus</i> sp. 2	6.69 e
<i>Penicillium</i> sp. 1	7.16 f
<i>Penicillium</i> sp. 2	6.91 ef
<i>Trichoderma aureoviride</i>	3.93 a
<i>Trichoderma harzianum</i> (V5)	4.35 bc
<i>Trichoderma harzianum</i> (R4)	4.09 ab
<i>Trichoderma harzianum</i> (R6)	4.54 c
<i>Trichoderma koningii</i>	4.18 ab
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (R6-1)	4.33 bc
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (R6-2)	4.61 c
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	4.36 bc
Control (<i>MP</i>)	7.51 g
Experimentos	
1	5.36 b
2	5.07 a

*Medias seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test de F ($P \leq 0.05$).



Figura 40. Placas de Petri sembradas en cultivos duales *M. phaseolina*-endófitos en APG al 2%.

Respuesta antagónica en la zona de interacción patógeno-antagonista

En las examinaciones microscópicas de la zona de interacción entre los endófitos y *MP* en los cultivos duales se encontraron diferentes alteraciones en las hifas del patógeno. Todas las combinaciones endófito-patógeno excepto para *Penicillium* sp. 1 y *Aspergillus* sp. 2 ocasionaron alteraciones a las hifas de *MP* (Tabla 29 y Figuras 41- 46).

Tabla 29. Alteraciones de hifas de *M. phaseolina* en las zonas de interacción con los endófitos, en cultivos duales

Cultivos duales	Alteraciones de hifas de <i>MP</i>
<i>M. phaseolina</i> - <i>Penicillium</i> sp. 2	Plasmólisis. Enrollamiento. Clamisdosporas
<i>M. phaseolina</i> - <i>T. koningii</i>	Plasmólisis. Enrollamiento
<i>M. phaseolina</i> - <i>T. harzianum</i> (V5,R4,R6)	Enrollamiento. Vaciamiento y plasmólisis
<i>M. phaseolina</i> - <i>T. pseudokoningii</i>	Plasmólisis
<i>M. phaseolina</i> - <i>T. aureoviride</i>	Plasmólisis. Enrollamiento
<i>M. phaseolina</i> - <i>T. longibrachiatum</i> (R6-1-R6-2)	Plasmólisis. Enrollamiento
<i>M. phaseolina</i> - <i>Aspergillus niger</i>	Plasmólisis

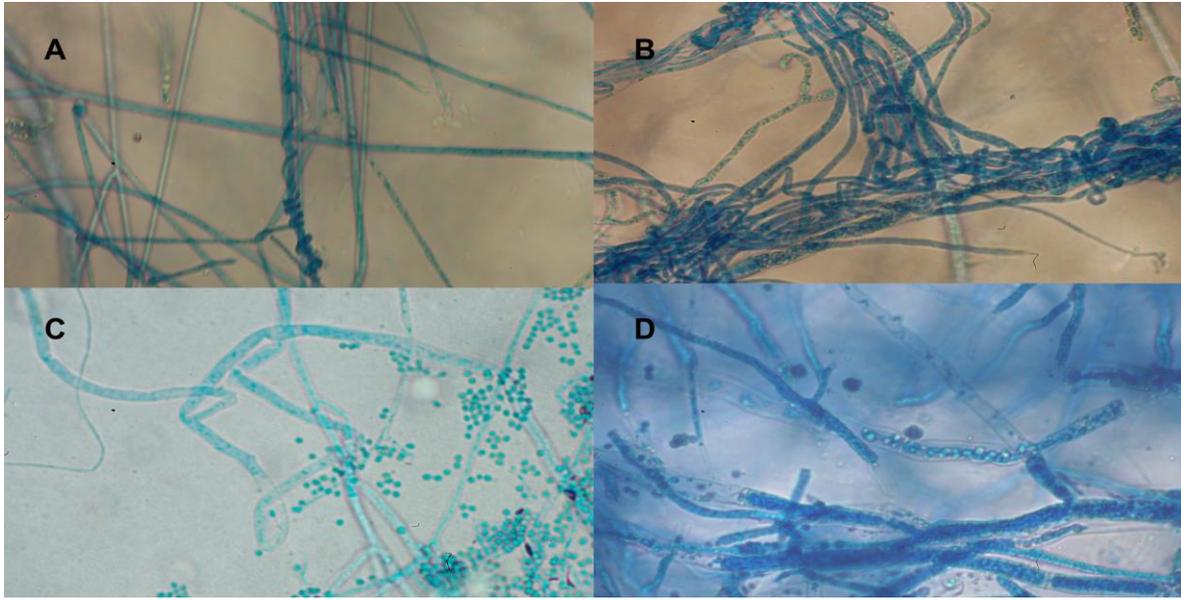


Figura 41. Alteraciones de *M. phaseolina* en interacción con *T. longibrachiatum*.

(A) Enrollamiento de hifas; (B) formación de barreras; (C) plasmólisis; (D) vaciamiento de hifas.



Figura 42. Formación de haustorios en interacción de *M. phaseolina* con *T. longibrachiatum*.

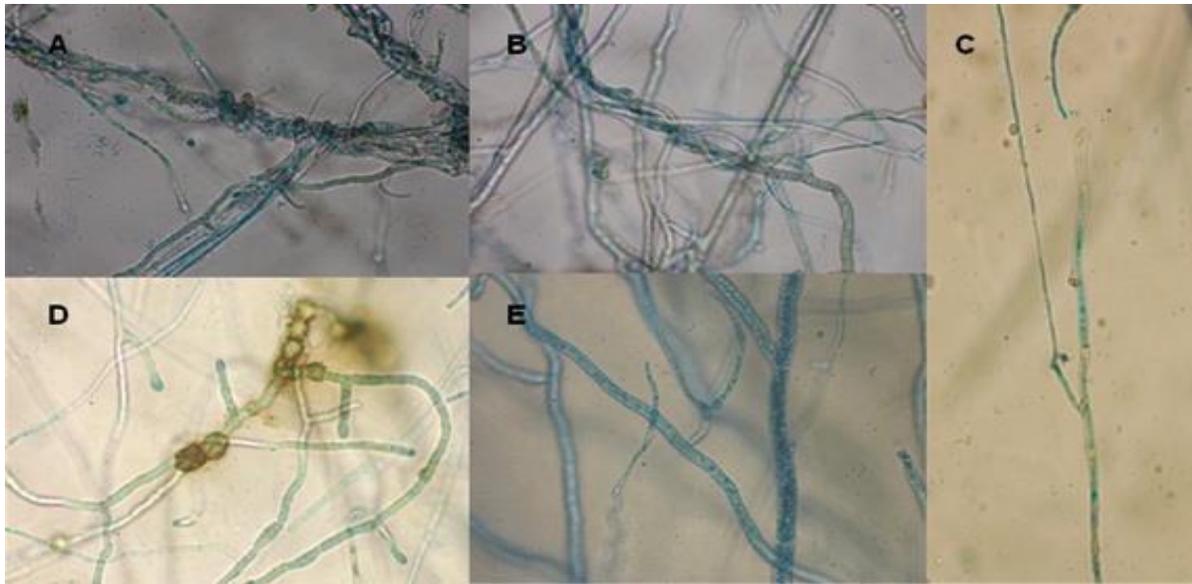


Figura 43. Altracciones de *M. phaseolina* en interacción con *Penicillium* sp. 2.

(A) Enrollamiento de hifas; (B) enrollamiento y plasmólisis de hifas; (C) parasitismo de una hifa; (D) zonas de melanización y formación de clamidosporas; (E) hifas testigo del *M. phaseolina*.

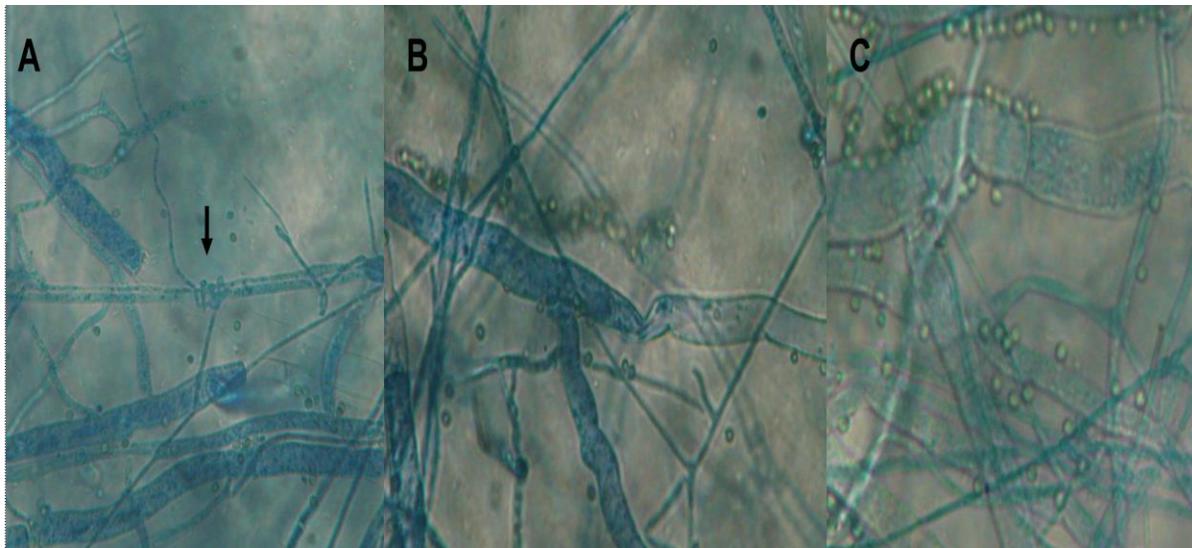


Figura 44. Alteraciones de *M. phaseolina* en interacción con *T. koningii*.

(A) Enrollamiento de hifas; (B) plasmólisis de hifas; (C) formación de haustorios.

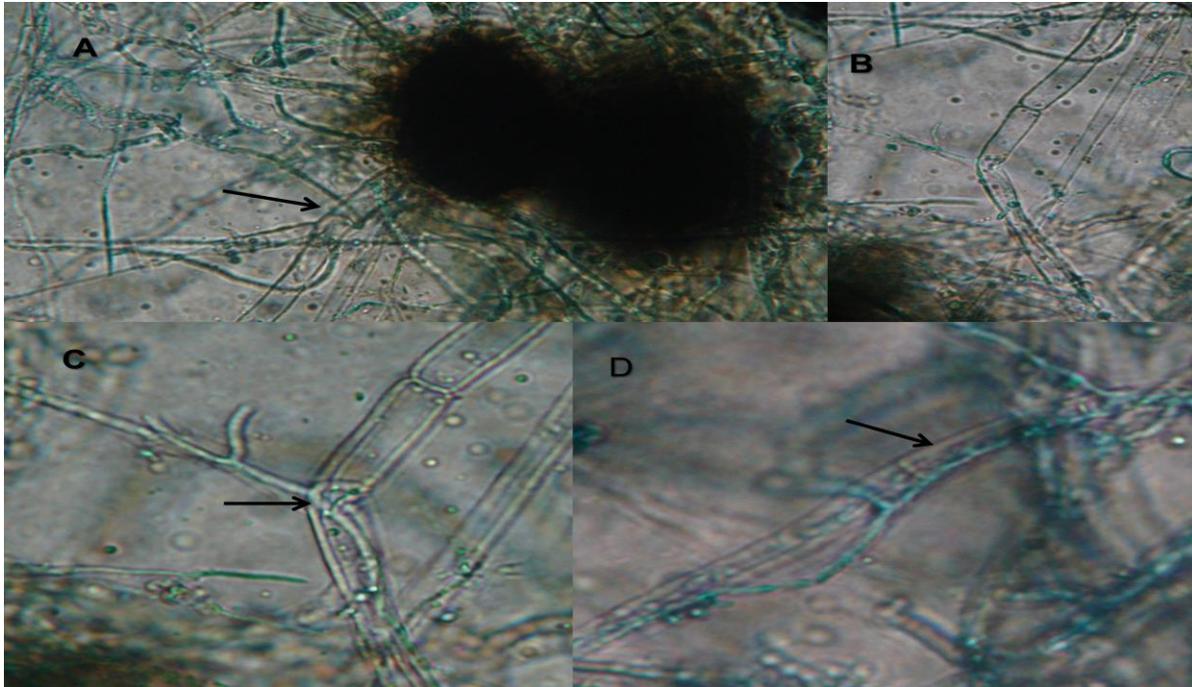


Figura 45. Alteraciones de *M. phaseolina* en interacción con *T. aureoviride*.

(A) Enrollamiento de hifas; (B) plasmólisis de hifas; (C) y (D) formación de haustorios.

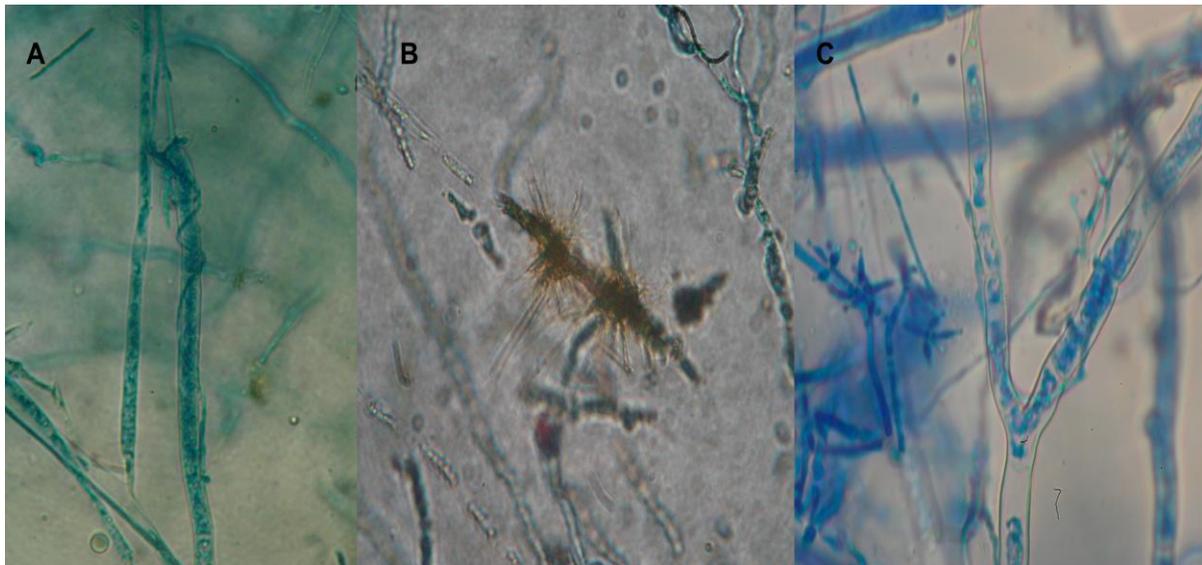


Figura 46. Alteraciones de *M. phaseolina* en interacción con *T. harzianum*.

(A) Enrollamiento de hifas; (B) incrustaciones pigmentadas; (C) formación de haustorios, vaciamiento y plasmólisis de hifas.

Asimismo, se observó micelio pigmentado en las zonas de interacción entre *MP* - *T. harzianum* y *MP* - *T. koningii* (Figura 47).



Figura 47. Micelio de *M. phaseolina* pigmentado en la zona de interacción con *T. harzianum*.

A los 20 días de la siembra de los cultivos duales en placas de Petri se realizó la evaluación macroscópica para determinar el tipo de interacciones de acuerdo a las observaciones de Porter (1924) y Dickinson y Boardman (1971). La mayoría de las interacciones fueron caracterizadas como de tipo B en las que ambos crecen pero luego el patógeno detiene su crecimiento y el endófito crece por encima, si bien en otras, ambos crecen inicialmente pero luego el endófito rodea al patógeno (Figuras 48 y 49).

Tipo B: interacciones de *MP* con: *T. koningii*, *T. harzianum* (V5, R4 y R6), *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2) y *Penicillium* (sp.1 y sp. 2) en las que si bien se observó un rápido crecimiento inicial del patógeno, luego el endófito creció sobre el patógeno.

Interacciones de *MP* con *Aspergillus niger* y *MP-Aspergillus* sp. 2 en las que ambos crecieron pero luego el patógeno se detuvo y fue rodeado por el endófito.

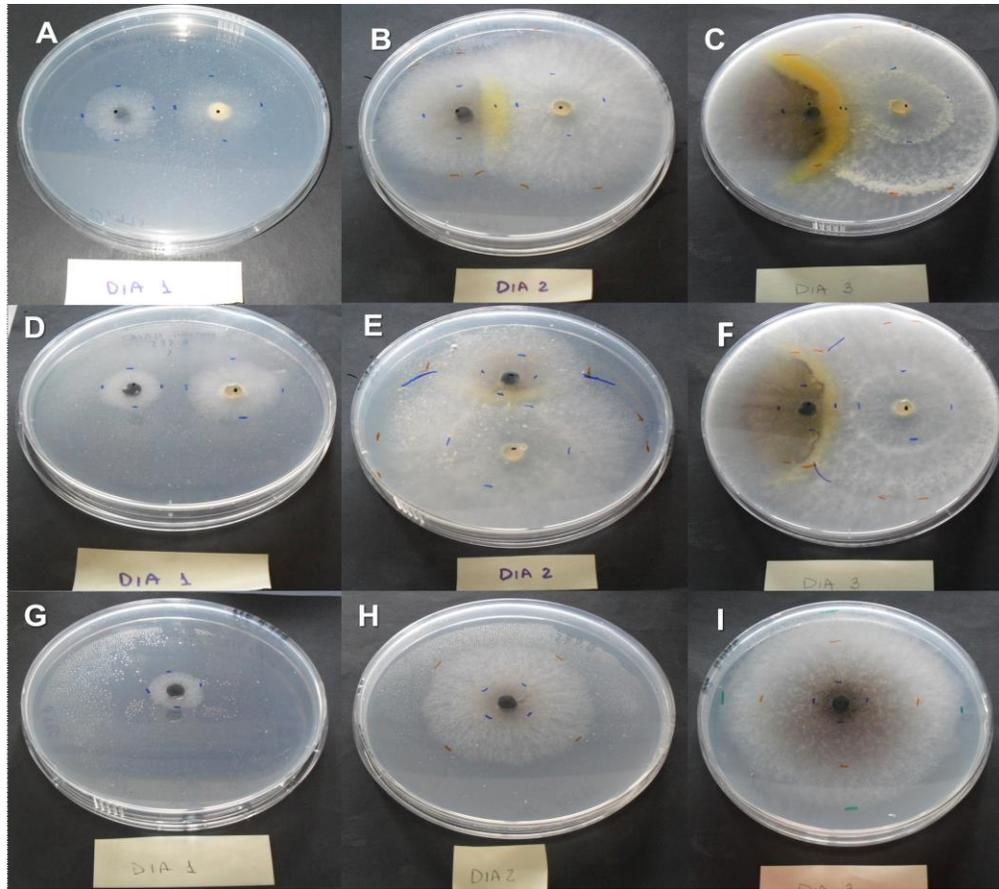


Figura 48. Interacciones en cultivos duales *M. phaseolina* - endófitos.

(A), (B) y (C) *M. phaseolina*-*T. harzianum*; (D), (E) y (F) *M. phaseolina*-*T. koningii*; (G), (H) e (I) *M. phaseolina* (testigo) a los días 1, 2 y 3 desde la siembra.

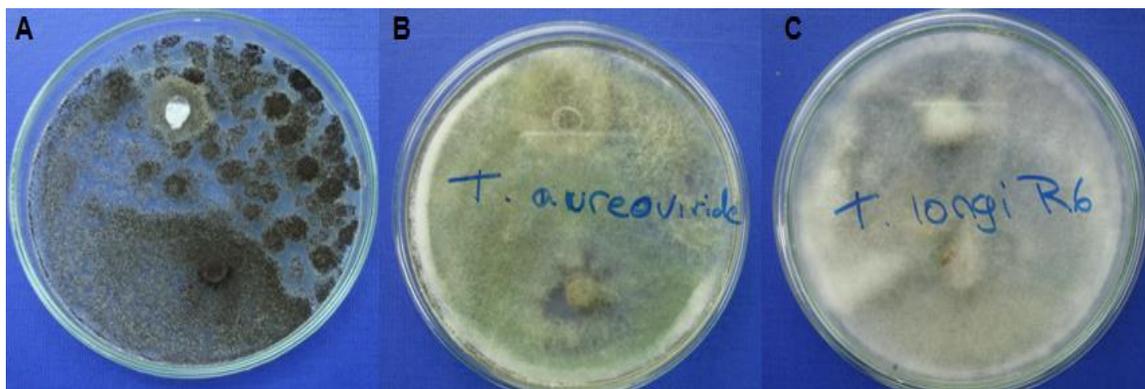


Figura 49. Interacciones *M. phaseolina*-endófitos en cultivos duales a los 20 días.

(A) MP - *Aspergillus niger*; (B) MP -*T. aureoviride*; (C) MP -*T. longibrachiatum*.

3.2.2. Bioensayos en semillas de soja peleteadas con endófitos en medio colonizado por *M. phaseolina*

El ANAVA de los resultados de la germinación de semillas de soja peletadas con los endófitos así como de los datos del largo de radícula de las semillas germinadas a los 6 días en comparación con los testigos mostró que hubo diferencias significativas en el número de semillas germinadas y en el largo de radícula entre los tratamientos, tal como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 30).

Tabla 30. ANAVA del número de semillas de soja germinadas y del largo de radícula en diez tratamientos con endófitos

Fuente de variación	Número de semillas			Largo de radícula	
	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*	Cuadrado medio	Valor de P
Tratamientos	9	12.70	≤0.001	2.38	0.003
Repeticiones	4	1.53	0.583	0.26	0.814
Error	36	2.12		0.66	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

En las pruebas *in vitro*, todos mejoraron el porcentaje de germinación y el largo de radícula con respecto al testigo sembrado en medio colonizado por *MP*, testigo enfermo (T9), sin embargo, se destaca el comportamiento de *T. harzianum* (V5) y las dos cepas de *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2) porque fueron estadísticamente significativos (Tabla 31) (Figura 50).



Figura 50. Bioensayo de semillas peleteadas con endófitos frente a *M. phaseolina*.

(A) Semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-2) en APG al 2% colonizado por *MP*; (B) testigo, semillas peleteadas con agar agua en APG al 2% colonizado por *MP*.

Tabla 31. Medias del número de semillas germinadas y largo de radícula de semillas de soja para los diez tratamientos con endófitos

Tratamientos	Nº de semillas germinadas	Largo de radícula (cm)
<i>Trichoderma koningii</i>	1.6 ab*	0.70 cd
<i>Trichoderma harzianum</i> (V5)	2.2 bc	0.65 bc
<i>Trichoderma harzianum</i> (R4)	1.8 abc	0.61 bcd
<i>Trichoderma harzianum</i> (R6)	1.0 ab	0.22 cd
<i>Trichoderma aureoviride</i>	1.4 ab	0.49 cd
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	1.6 ab	0.63 cd
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (R6-1)	2.6 bc	1.31 bc
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (R6-2)	3.6 c	1.77 b
Testigo en medio con <i>MP</i>	0.0 a	0.00 d
Testigo en APG al 2%	5.8 d	2.20 a

*Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no difieren estadísticamente de acuerdo al Test de F ($P \leq 0.05$).

En todos los tratamientos se observaron semillas con necrosis en los extremos de las radículas mostrando en algunos casos necrosis un poco más avanzada como puede observarse en la Figura 51, excepto en el testigo en APG al 2%.



Figura 51. Comparación del largo de radícula de semillas de soja germinadas en medio colonizado por *M. phaseolina* y en APG al 2%.

Izquierda: las flechas marcan la necrosis radicular; derecha: testigo.

3.3. Bioensayo de antagonismo frente a *M. phaseolina in vivo*

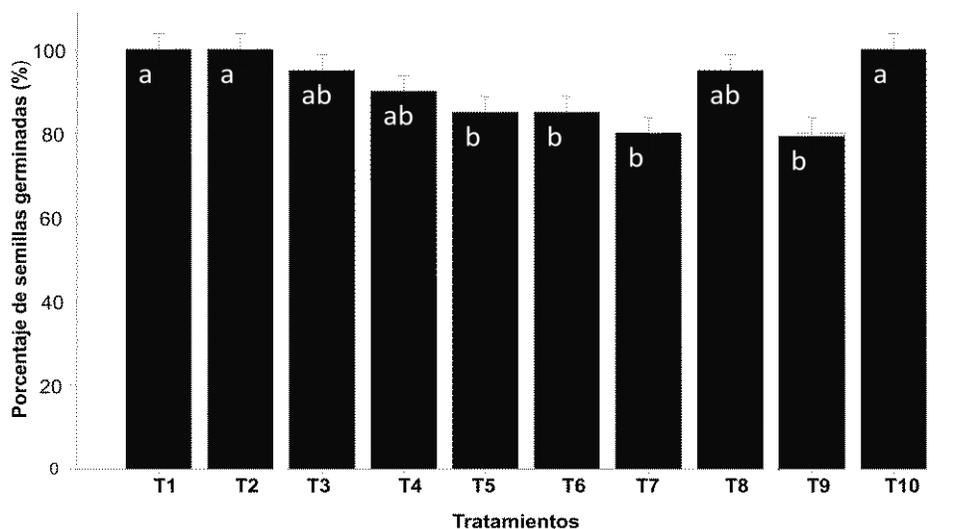
Los resultados de las observaciones de las plántulas desarrolladas a partir de las semillas peleteadas con los endófitos, en el sustrato inoculado con *MP* mostraron diversos síntomas característicos de la podredumbre carbonosa. Como se muestra en la Tabla 32 los tratamientos se comportaron diferencialmente en la protección frente a *MP*.

Tabla 32. ANAVA del efecto de los endófitos en la protección frente a *M. phaseolina* en el bioensayo *in vivo*

Fuente de variación	Germinación de semillas			Cotiledones con síntomas		Plántulas detenidas al estado de cotiledón		Plántulas débiles/muertas	
	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de P*	Cuadrado medio	Valor de P	Cuadrado medio	Valor de P	Cuadrado medio	Valor de P
Repeticiones	3	0.01		0.01		0.25		0.03	
Tratamientos	9	0.14	≤0.001	0.29	≤0.001	0.06	0.021	0.13	≤0.001
Error	27	0.03		0.03		0.02		0.02	

*Test de F ($P \leq 0.05$).

Hubo diferencias significativas entre los tratamientos para la germinación de las semillas de soja peleteadas con los endófitos. Como puede observarse en la Figura 52, la presencia de *MP* en el sustrato ocasionó una reducción del 20% en la germinación de las semillas peleteadas con agar agua (testigo enfermo, T9), con respecto a las semillas sembradas en sustrato sin inóculo (testigo sano, T10). Los tratamientos con endófitos que mejoraron significativamente el porcentaje de germinación con respecto al testigo enfermo (T9) fueron *T. koningii* y *T. harzianum* (V5).



Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$). Tratamientos: T1: semillas de soja peleteadas con *T. koningii*; T2: semillas peleteadas con *T. harzianum* (V5); T3: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R4); T4: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R6); T5: semillas peleteadas con *T. aureoviride*; T6: semillas peleteadas con *T. pseudokoningii*; T7: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-1); T8: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-2); T9: testigo enfermo: semillas peleteadas con agar agua en suelo inoculado con *MP*; T10: testigo sano: semillas peleteadas con agar agua en suelo sin inoculación con *MP*.

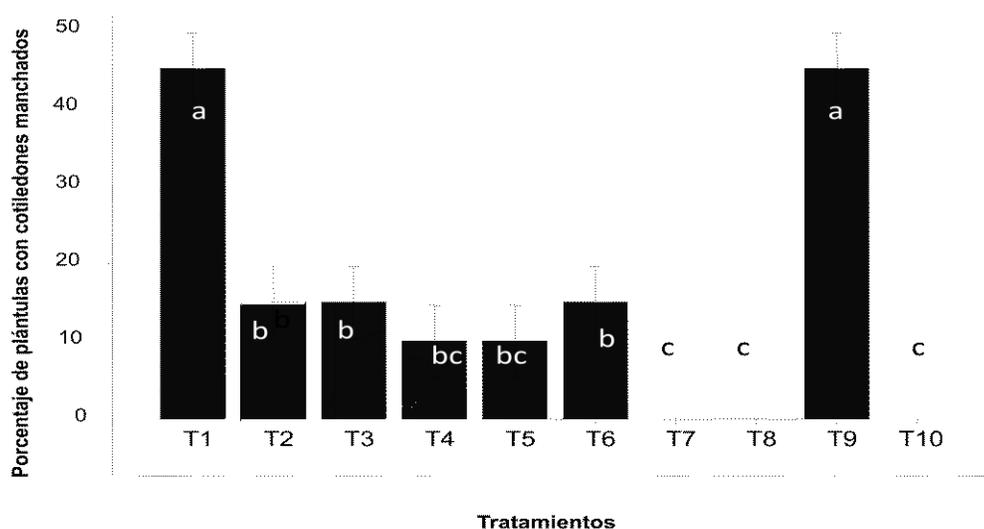
Figura 52. Porcentaje de germinación de semillas de soja peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con *M. phaseolina* en comparación con los testigos.

Hubo diferencias significativas en los valores observados de cotiledones con síntomas de podredumbre carbonosa entre los tratamientos (Tabla 32). La evaluación mostró que casi la mitad (45%) de las plántulas del testigo enfermo presentaron los cotiledones con sintomatología característica de la podredumbre carbonosa observándose como manchas pardo oscuras, irregulares, aisladas o confluentes (Figuras 53 y 54). Sin embargo, el peleteado de semillas con

especies de *Trichoderma* (excepto con *T. koningii*) contribuyó significativamente a reducir esta sintomatología. En particular, puede destacarse el efecto de *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2) por su buen comportamiento frente a *MP* respecto a las otras especies.



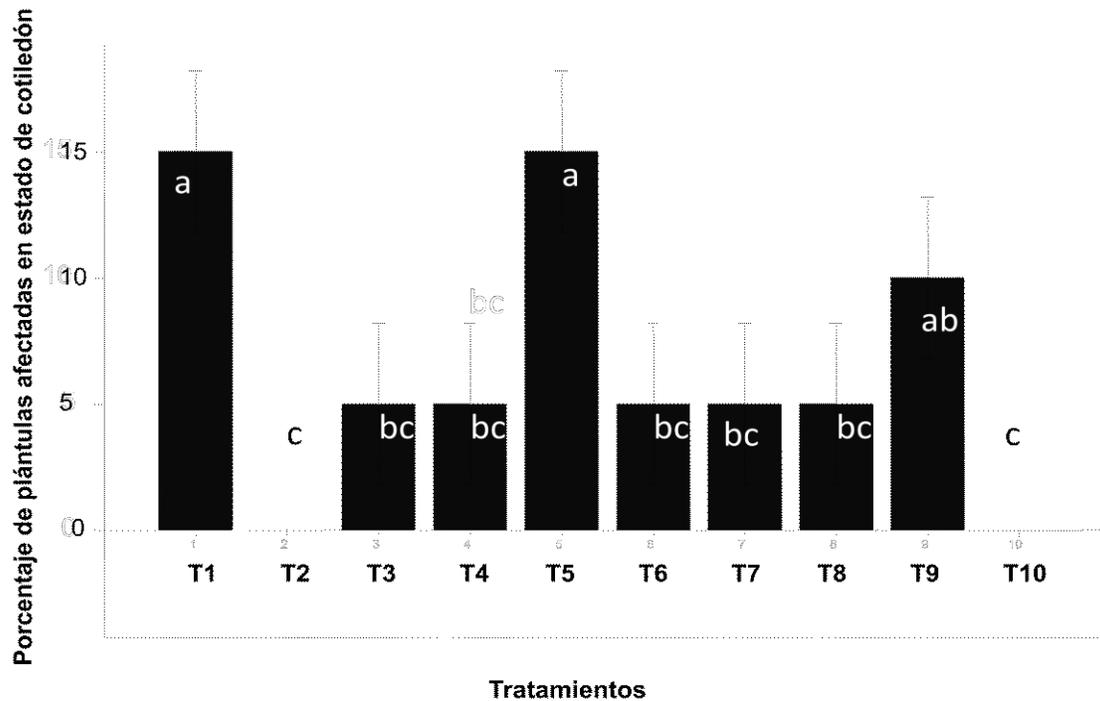
Figura 53. Cotiledones de soja con síntomas de podredumbre carbonosa.



Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$). Tratamientos: T1: semillas de soja peleteadas con *T. koningii*; T2: semillas peleteadas con *T. harzianum* (V5); T3: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R4); T4: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R6); T5: semillas peleteadas con *T. aureoviride*; T6: semillas peleteadas con *T. pseudokoningii*; T7: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-1); T8: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-2); T9: testigo enfermo: semillas peleteadas con agar agua en suelo inoculado con *MP*; T10: testigo sano: semillas peleteadas con agar agua en suelo sin inoculación con *MP*.

Figura 54. Plántulas de soja con síntomas de podredumbre carbonosa en cotiledones emergidas de semillas de soja peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con *M. phaseolina*.

Los resultados del ANAVA mostraron que hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a las plántulas detenidas y/o muertas al estado de cotiledón. Las medias de los tratamientos se muestran en la Figura 55. Al ser extraídas del sustrato, estas plántulas de crecimiento detenido, presentaron raíces destruidas o con necrosis (Figura 56 y 57).



*Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$). Tratamientos: T1: semillas de soja peleteadas con *T. koningii*; T2: semillas peleteadas con *T. harzianum* (V5); T3: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R4); T4: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R6); T5: semillas peleteadas con *T. aureoviride*; T6: semillas peleteadas con *T. pseudokoningii*; T7: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-1); T8: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-2); T9: testigo enfermo: semillas peleteadas con agar agua en suelo inoculado con *MP*; T10: testigo sano: semillas peleteadas con agar agua en suelo sin inoculación con *MP*.

Figura 55. Plántulas de soja con crecimiento detenido/muertas en estado de cotiledón, emergidas de semillas peleteadas con endófitos, en sustrato inoculado con *M. phaseolina*.



Figura 56. Síntomas de la podredumbre carbonosa. Detención de plántulas en estado de cotiledón.



Figura 57. Raíces de plántulas de soja necrosadas por *M. phaseolina*.

Como puede verse en la Figura 55, el tratamiento con *T. harzianum* (V5) fue el único que redujo significativamente esta sintomatología en un 100%, con respecto al testigo enfermo (T9). Sin embargo, puede resaltarse que los tratamientos con *T. harzianum* (R4 y R6), *T. pseudokoningii* y con *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2) redujeron en un 50% los síntomas al estado de cotiledón.

También hubo diferencias significativas entre los tratamiento para el desarrollo de plántulas débiles, más pequeñas o muertas a los 21 días en comparación con las plántulas del testigo sano (T10). Algunas de estas plántulas además presentaron podredumbre basal (Figuras 58 y 59).



Figura 58. Plántulas debilitadas, con cotiledones manchados, podredumbre basal y destrucción radicular en comparación con plántulas de tratamientos testigo.

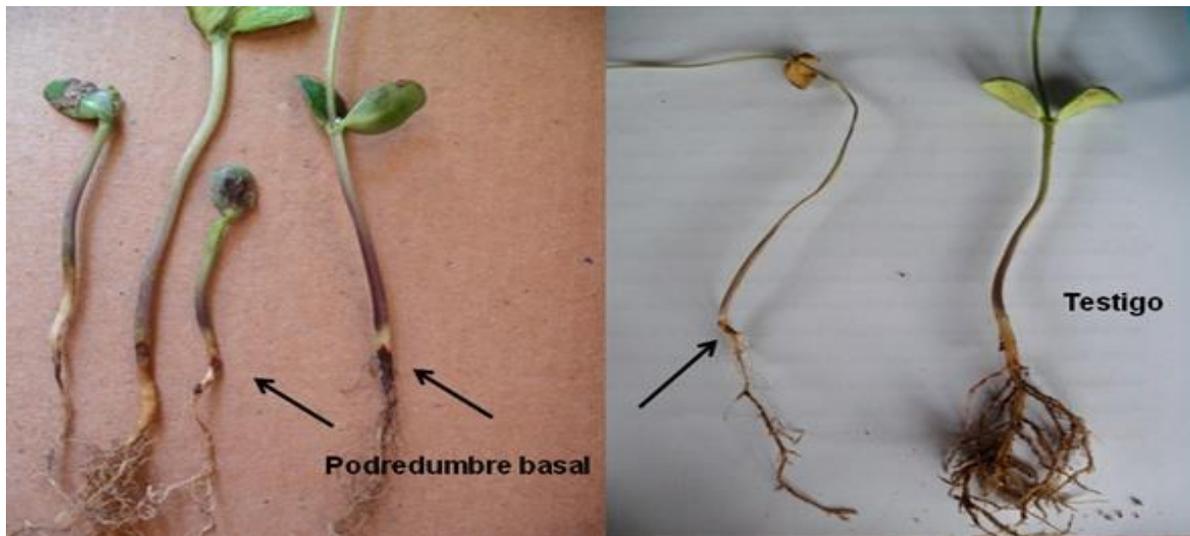
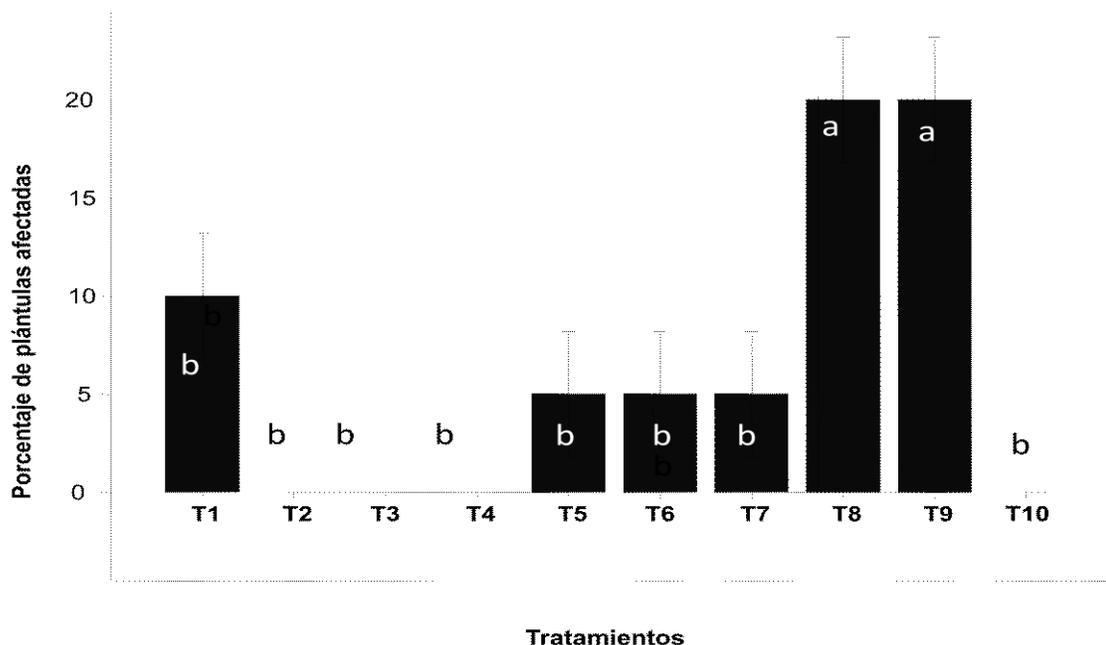


Figura 59. Plántulas con podredumbre basal ocasionada por *M. phaseolina* en comparación con una plántula testigo.

Todos los tratamientos redujeron esta sintomatología en comparación con el testigo enfermo (T9), excepto con *T. longibrachiatum* R6-2. Los valores máximos del 20% de plántulas débiles o muertas correspondieron al testigo enfermo y al tratamiento con *T. longibrachiatum* (R6-2). Se destacaron los tratamientos con *T. harzianum* que fueron los que tuvieron el mayor efecto protector de las plántulas de soja seguidos por los tratamientos con *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* (R6-1) (Figura 60).



*Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$). Tratamientos: T1: semillas de soja peleteadas con *T. koningii*; T2: semillas peleteadas con *T. harzianum* (V5); T3: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R4); T4: semillas peleteadas con *T. harzianum* (R6); T5: semillas peleteadas con *T. aureoviride*; T6: semillas peleteadas con *T. pseudokoningii*; T7: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-1); T8: semillas peleteadas con *T. longibrachiatum* (R6-2); T9: testigo enfermo: semillas peleteadas con agar agua en suelo inoculado con *MP*; T10: testigo sano: semillas peleteadas con agar agua en suelo sin inoculación con *MP*.

Figura 60. Plántulas de soja débiles/más pequeñas/muertas emergidas de semillas de soja peleteadas con endófitos en sustrato inoculado con *M. phaseolina* a los 21 días..

En síntesis, todos los endófitos evaluados redujeron alguna de las sintomatologías características de la podredumbre carbonosa al ser aplicados como cobertura de la semilla. Puede mencionarse que se observó una tendencia de mejora de la germinación en la mayoría de los tratamientos con endófitos en (T9), sin embargo, solo fueron significativos los tratamientos con *T. koningii* y *T. harzianum* (V5) en comparación con el testigo enfermo. *T. koningii* no redujo los síntomas típicos de la podredumbre carbonosa en cotiledones ni tampoco el porcentaje de plantas detenidas al estado de cotiledón en comparación con el testigo enfermo; *T. longibrachiatum* (R6-2) no logró disminuir el porcentaje de plantas débiles o muertas, entre otras.

Asimismo, puede resaltarse que si bien el tratamiento de semillas de soja con *T. longibrachiatum* (R6-1) no mejoró el porcentaje de germinación con respecto al testigo enfermo

y a su vez, *T. aureoviride* y *T. pseudokoningii* solo lo mejoraron levemente (Figura 52), a los 21 días presentaron valores mucho más bajos de plántulas debilitadas o muertas en comparación con los presentados por éste (Figura 60). Asimismo, al compararse los valores medios de plántulas con sintomatología de la podredumbre carbonosa en los cotiledones en la evaluación a los 15 días y a los 21 días puede observarse una disminución en el avance de la enfermedad en las plántulas sobrevivientes en la mayoría de los tratamientos. Así los valores fueron para *T. koningii*: 45 y 10; *T. harzianum* (V5) 15 y 0; *T. harzianum* (R4): 15 y 0; *T. harzianum* (R6): 10 y 0; *T. aureoviride*: 10 y 0 y *T. pseudokoningii* 15 y 5 para plántulas con síntomas en cotiledones y plántulas débiles/muertas a los 21 días, respectivamente. Por el contrario, *T. longibrachiatum* (R6-1), *T. longibrachiatum* (R6-2) y el testigo enfermo incrementaron el número de plántulas de 0 a 5, 0 a 20 y de 10 a 20 respectivamente.

De acuerdo a estos resultados, el tratamiento con *T. harzianum* (V5) puede remarcarse como el más efectivo ya que presentó los mayores valores de porcentaje de germinación y se destacó en la protección de las plántulas frente a *MP* para las sintomatologías evaluadas en comparación con el testigo enfermo y en la protección frente al avance de la enfermedad desde la emergencia hasta los 21 días.

4. Discusión

El manejo de los hongos del suelo es una tarea sumamente difícil, lo cual puede verse reflejado en la escasa efectividad de los tratamientos en los que se involucra la aplicación de productos fitosanitarios. Sin embargo, en las últimas décadas ha surgido la tendencia al uso de nuevas alternativas amigables con el ambiente y con el hombre para la reducción de las enfermedades ocasionadas por estos hongos. El género *Trichoderma* es uno de los agentes de biocontrol más estudiado en las últimas décadas, obteniéndose buenos resultados frente a patógenos del suelo como *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pythium* sp. utilizando como antagonista a *T. harzianum* (Hadar y Henis, 1979; Cook y Baker, 1983, Melo, 1991; Inbar *et al.*, 1996). Asimismo, se ha demostrado la capacidad antifúngica de *T. koningii*, aislado como endófito de raíces de maíz, frente a enfermedades de este hospedante (Orole y Adejumo, 2009).

Diferentes especies de *Trichoderma* han sido evaluadas como agentes biocontroladores frente a *MP* en varios hospedantes como girasol, ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) y poroto

(*Phaseolus vulgaris* L.) con resultados promisorios (Pineda y Gonnella, 1988; Reséndiz Arvizu, 2009). Entre ellas, puede mencionarse a una cepa nativa de suelo de *T. koningii* que fue efectiva en la reducción de la incidencia de la podredumbre carbonosa en aplicaciones a la semilla de arveja (*Pisum sativum*) (Lifshitz *et al.*, 1986) y *T. harzianum* que redujo entre un 30 y 60% la germinación de los esclerocios de *MP* (Srivastava *et al.*, 1996). En soja, Torrealba y *et al.* (2015) utilizando cepas de *Trichoderma* nativas del suelo de una región con antecedentes de incidencia de podredumbre carbonosa, reportó que la inoculación de semillas al momento de la siembra no solo protegió a las plántulas de la infección con *MP*, sino que además aumentó su vigor. Sin embargo, son pocos los estudios de la capacidad antagonica de especies endófitas frente a este patógeno tales como las pruebas *in vitro* de Dalal y Kulkarni (2014b) y Dalal *et al.* (2014).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos en los bioensayos de antagonismo en cultivos duales frente a *MP* mostraron que todas las especies endófitas de *Trichoderma* evaluadas presentaron capacidad para reducir al patógeno. Las especies que se destacaron fueron *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii* quienes a su vez ocasionaron alteraciones de hifas tales como plasmólisis, vaciamiento y enrollamiento en la zona de interacción endófito-patógeno. De acuerdo a estos resultados y a los obtenidos en los cultivos duales podría sugerirse que el antagonismo de estas especies de *Trichoderma* fue mediado por la competencia y el micoparasitismo.

Además de su alta velocidad de crecimiento, gran producción de conidios y sus escasos requerimientos nutricionales se ha demostrado que la mayoría de las especies de *Trichoderma* evaluadas hasta la fecha utilizan uno o mas mecanismos de acción como agentes biocontroladores. Estos mecanismos pueden ser directos sobre el patógeno, tales como antibiosis, competencia por sustrato y micoparasitismo o actúan indirectamente alterando la fisiología de la planta, a través del aumento de la resistencia al ataque del patógeno y en algunos casos, promueven el crecimiento del hospedante, si bien algunos autores consideran que la competencia es el principal mecanismo que utiliza este género fúngico en el biocontrol (Howell, 2003; Infante *et al.*, 2009; Reséndiz Arvizu, 2009; Stocco, 2014). Tal como se ha registrado en los ensayos realizados aquí, Dennis y Webster (1971) al enfrentar en cultivos duales diferentes especies de *Trichoderma* con diversos fitopatógenos reportaron el enrollamiento de las hifas de los patógenos evaluados. Inbar *et al.* (1996) estudiando el micoparasitismo ejercido por hifas de *Trichoderma* frente a *S. sclerotiorum* demostraron que involucraron el enrollamiento de hifas del patógeno, seguido de la fijación y penetración. Harman *et al.* (2004) observaron que las hifas de *Trichoderma* frente al patógeno luego de

enrollarse forman apresorios en su superficie produciendo perforaciones por donde penetran al lumen. Asimismo, Elad (1996) demostró, utilizando microscopía electrónica, que en las interacciones de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani* y *S. rolfsii* las hifas del antagonista se adhieren a las hifas del patógenos, degradando las paredes celulares y el contenido citoplasmático por liberación de enzimas líticas y, en algunos casos ocasiona vacuolación.

La aplicación de antagonistas utilizando la técnica de peleteado de semillas con agar agua mostró buenos resultados en la protección frente a la podredumbre carbonosa. En este sentido, puede mencionarse que autores como Cordo *et al.* (2007) y Stocco (2014) obtuvieron, a través del peleteado de semillas de trigo con especies de *Trichoderma* aisladas de suelo, la reducción de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt, agente causal de la mancha de la hoja o septoriosis. Por su parte, Perelló *et al.* (2006) demostraron la efectividad de seis aislamientos de *T. harzianum* y uno de *T. koningii* aplicadas peleteando semillas de trigo en la reducción de la incidencia y severidad de la mancha amarilla del trigo (*Ptr*) y de la septoriosis (*M. graminicola*) en ensayos de campo.

En el bioensayo *in vitro*, todas las cepas de *Trichoderma* inoculadas con esta técnica fueron efectivas en la protección frente a *MP* cuando las semillas crecieron en medio de cultivo colonizado por el patógeno en comparación con el testigo solo peleteado con agar agua. Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron con las dos cepas de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (V5), y en largo de radícula se destacaron también las dos cepas de *T. longibrachiatum*.

En el bioensayo en condiciones semicontroladas *in vivo* todos los endófitos evaluados redujeron alguna de las sintomatologías características en plántulas de soja. De los resultados obtenidos puede mencionarse que los tratamientos con ambas cepas de *T. longibrachiatum* presentaron un buen efecto antagónico frente a *MP*, sin embargo mostró variaciones en su comportamiento según las pruebas.

Asimismo, cabe destacar que al considerarse los resultados obtenidos, de los porcentajes de plántulas con podredumbre carbonosa al estado de cotiledón y a los 21 días podría sugerirse que los endófitos con el paso del tiempo protegerían mejor a las plántulas de soja posiblemente al aumentar la colonización del hospedante y por la producción de antibióticos, promoción del crecimiento, inducción de resistencia u otro mecanismo involucrado en el biocontrol. De esta manera, algunas plántulas afectadas al estado de cotiledón podrían haberse recuperado emergiendo sin presentar el síntoma característico de debilitamiento.

Cabe mencionar que las plantas del testigo sano (semillas peleteadas con agar agua y sembradas en sustrato sin inocular) no presentaron síntomas de la podredumbre carbonosa.

Algunos endófitos mostraron un comportamiento similar al observado en estas plantas testigo, por ejemplo, los valores de germinación de los tratamientos con *T. koningii* y *T. harzianum* (V5) fueron del 100% al igual que los del testigo sano; los tratamientos con *T. longibrachiatum* R6-1 y R6-2 no presentaron síntomas en cotiledones como el testigo sano; *T. harzianum* (V5) no mostró plántulas afectadas con crecimiento detenido o muertas al estado de cotiledón igual que el testigo sano y los tratamientos con *T. harzianum* (V5, R4 y R6) no mostraron plantas débiles, más pequeñas ni muertas a los 21 días al igual que el testigo sano.

Debido a que las especies de *Trichoderma* endófitas evaluadas en este trabajo mostraron un potencial efecto protector frente a *MP* y que han sido aisladas de plantas de soja permite sugerir que podrían estar adaptadas ecológicamente a su hospedante siendo ésta una de las ventajas en su efecto antagonista. De acuerdo a Vinale *et al.* (2008), las hifas de *Trichoderma* penetran la corteza de las raíces y colonizan los tejidos de las plantas, lo cual favorece un nicho nutricional para estos hongos y una simbiosis con la planta protegiéndola de las enfermedades.

Entre los endófitos se destacó *T. harzianum* por su potencial antagónico frente a *MP*, que fue aislado de tallos de plantas de soja en el estadio V5. En relación a ello cabe mencionar que existe una intensa investigación en esta especie fúngica siendo el primer agente de biocontrol en ser comercializado, registrado y utilizado con buenos resultados en el manejo de diversos fitopatógenos entre ellos *S. sclerotiorum* (Freeman *et al.*, 2004).

5. Conclusiones

Todos los endófitos evaluados por su potencial biocontrolador frente a *MP* redujeron el crecimiento de las colonias del patógeno en los cultivos duales en comparación con el testigo, destacándose el efecto de *T. aureoviride*, *T. harzianum* (aislados en los estadios V5, R4 y R6), *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* (R6-1 y R6-2). Los endófitos que se destacaron por su efecto en la reducción del patógeno también ocasionaron alteraciones de hifas en las zonas de interacción endófito-patógeno.

Las dos cepas de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* (V5), aplicados con la técnica de peleteado de semillas y sembrados en medio de cultivo colonizado por *MP* mejoraron significativamente los porcentajes de germinación y el largo de radícula de las semillas de soja, con respecto al testigo enfermo.

En los bioensayos *in vivo*, si bien se observaron algunas variaciones en el comportamiento, todos los endófitos evaluados mostraron efectividad en la protección frente a *MP* al reducir alguna de las sintomatologías características de la podredumbre carbonosa en plántulas, en comparación con el testigo enfermo. Asimismo, se observó una disminución del avance de la enfermedad desde la germinación hasta los 21 días en la mayoría de los tratamientos.

De las pruebas realizadas puede destacarse el tratamiento con *T. harzianum* (V5) que fue efectivo en la mejora de la germinación, en el largo de radícula y en la protección de las plántulas frente a la podredumbre carbonosa.

Más ensayos deberían ser realizados para confirmar estos resultados, en particular, por las condiciones abióticas del medio real como el clima, condiciones del suelo, humedad y pH y, bióticas como la microbiota del suelo o de la planta. Sin embargo, lo obtenido resulta promisorio para ser considerado como una alternativa potencial dentro del manejo integrado de esta patología en el marco de una agricultura sustentable.

CAPITULO V. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

1. Discusión general

Las plantas son consideradas por los fitopatólogos comunidades complejas asociadas con diferentes grupos funcionales de hongos, tales como micorrizas, patógenos, epífitos, endófitos y saprófitos, los cuales interactúan entre sí y con el hospedante (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). En los últimos años ha surgido como interesante el estudio de los microorganismos endófitos no clavicipitaceos, debido a que han sido encontrados en todas las plantas estudiadas a la fecha de diferentes regiones climáticas y se ha demostrado que son capaces de proveer importantes avances en los sistemas biológicos. Asimismo, se ha demostrado que los endófitos pueden conferir beneficios a sus hospedantes como la tolerancia al stress abiótico (sequía, calor, sales) y biótico (patógenos y herbívoros) y pueden mejorar y promover el crecimiento de sus hospedantes mejorando su adaptabilidad ecológica (Rodríguez *et al.*, 2008; Dalal y Kulkarni, 2014a,b). Las comunidades endófitas pueden depender de múltiples factores incluyendo el hospedante, la densidad de las plantas, la disponibilidad de nutrientes, las condiciones ambientales y la interacción con los micobiotas externos (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). Debido a que no existen en Argentina antecedentes previos de estudios de las comunidades endofíticas del trigo y de la soja para su evaluación como potenciales agentes de biocontrol de enfermedades de importancia económica se plantearon los objetivos que se desarrollaron en el transcurso de esta tesis.

Como resultado de estas investigaciones, se aislaron un gran número de especies fúngicas endofíticas a partir de ambos hospedantes, sin embargo, pocas de ellas fueron registradas con altas frecuencias, coincidiendo con lo encontrado por otros autores en el estudio de las comunidades endofíticas de diferentes hospedantes (Petrini *et al.*, 1992; Dalal y Kulkarni, 2014a; Gomes Fernandes *et al.*, 2015). A su vez, la mayoría de los endófitos fúngicos aislados de trigo y soja en este trabajo pertenecen a varias clases del Phylum Ascomycota tales como Dothidiomycetes, Sordariomycetes, Eurotiomycetes y Leotiomycetes en acuerdo con los estudios realizados por varios autores en otros hospedantes (Arnold, 2007; Porras-Alfaro y Bayman, 2011; Gomes Fernandes *et al.*, 2015). Algunos de ellos, corresponden a especies comunes y frecuentes en la mayoría de los hospedantes estudiados hasta la fecha, los cuales son considerados “generalistas” y ubicuos, tales como *A. alternata* y *C. herbarum*. Otras especies endofíticas fueron aisladas con menores frecuencias, denominadas “especies raras” por Arnold (2007), quien a su vez ha sugerido que éstas podrían ser específicos del hospedante. De acuerdo a ello, podría sugerirse que los endófitos *Acremonium* sp. y *Helicocephalum* sp. aislados de trigo y *Spegazzinia tessartha* y *Arthrimum* sp., encontrados en soja podrían ser

específicos de cada uno de ellos. Sin embargo, debería considerarse que ellos podrían ser competidores débiles frente a otros que han logrado colonizar más rápidamente los tejidos del hospedante.

Los endófitos aislados del trigo y de la soja en este trabajo pueden ser clasificados de la siguiente manera: 1) especies de conocidos patógenos de importancia económica (*B. sorokiniana* y *F. graminearum*, en trigo y *C. truncatum* y *Phomopsis sojae*, en soja), los cuales podrían ser patógenos latentes, patógenos débiles o cepas avirulentas; 2) especies abundantes en el filoplano que podrían ser considerados saprobios latentes o menores patógenos como *C. herbarum*, *A. alternata*, *Epicoccum nigrum* y *S. botryosum*, y 3) especies como *Bacillus* sp. y *Trichoderma* spp., los cuales podrían ser simbiontes naturales. Estos resultados son coincidentes con lo encontrado por diferentes autores quienes sostienen que los endófitos pueden cumplir múltiples roles ecológicos en la naturaleza, tal el caso de *C. globosum*, endófito de diferentes hospedantes, saprótrofo y patógeno (Arnold, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008). Si bien, como se mencionó con anterioridad, la mayoría de las especies endófitas aisladas de los hospedantes estudiados han sido registradas con bajas frecuencias y, debido a los múltiples roles que estos microorganismos pueden desempeñar en el hospedante, incluyendo la protección del mismo, su trascendencia ecológica es considerada muy valiosa por la importancia que revisten en los estudios de diversidad, en particular en la búsqueda de agentes con potencial biocontrolador, por sus efectos como integrantes de la estructura de las comunidades de las plantas y su interacción con el hospedante.

En trigo y soja se encontró una gran diversidad de especies endófitas, las cuales presentaron una dinámica espacial observada por sus variaciones cuali-cuantitativas en los diferentes órganos vegetativos y reproductivos evaluados. En trigo, la mayor diversidad específica fue encontrada en las hojas seguida por los tallos, granos y glumas mientras que en soja la mayor diversidad correspondió a los tallos seguidos por las hojas, vainas y granos. En este sentido, diferentes autores consideran a los órganos aéreos, en particular las hojas, como las interfases más dinámicas entre las plantas y el medio ambiente en comparación con otros órganos, ya que están expuestas a cambios bioquímicos rápidos por su corta vida, a variaciones ambientales, corrientes de aire, radiación y al daño por herbívoros y, en las cuales se han encontrado las mayores diversidades (Fisher *et al.*, 1995; Arnold, 2007). Sin embargo, la mayoría de estos estudios de diversidad han sido realizados en especies forestales comparándose la diversidad de hojas con ramas y cortezas, de más larga vida, y por otro lado, cada tipo de tejido, por sus características específicas en cada hospedante debería ser considerado como un microhabitat particular en el estudio de las comunidades endofíticas.

Algunos investigadores sugirieron que cada órgano sería un microhábitat al cual ciertos endófitos estarían adaptados ecológicamente, reconociéndose como “órgano-especificidad” (Petrini *et al.*, 1992). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se podría sugerir que *N. sphaerica*, *Phoma* sp., *P. herbarum*, *Stachybotrys* sp. y *S. tritici* que fueron aislados sólo de hojas de trigo y que *Acremonium* sp. y *Helicocephalum* sp. solo de tallos, podrían ser específicos de estos órganos. Lo mismo fue observado en soja con *Aspergillus* sp. 1, *Leptosphaeria* sp. y *T. hamatum*, que sólo fueron aislados de las hojas y *Spegazzinia tessartha*, *D. phaseolorum* y *M. striatisporum* solo de tallos, y que *P. herbaum* solo fue obtenido de vainas.

Otra dimensión espacial analizada en el estudio de los endófitos fueron los diferentes cultivares de trigo evaluados. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas en sus comunidades, excepto al evaluarse los órganos separadamente ya que sólo hubo diferencias para las glumas. Similares resultados fueron obtenidos por Sieber *et al.* (1988) en sus estudios con diferentes cultivares de trigo resistentes a *Stagonospora nodorum*.

Las comunidades endofíticas del trigo y la soja mostraron a su vez una dinámica temporal observada en las variaciones cuali-cuantitativas en los diferentes estadíos fenológicos evaluados. En ambos hospedantes, la riqueza mostró una tendencia de aumento de las especies desde los estadíos vegetativos hacia los reproductivos, observándose una disminución en el último estadío analizado, siendo más pronunciada en la soja que en trigo. Estos resultados son concordantes con los encontrados en trigo y soja por otros autores (Sieber *et al.*, 1988; Dalal y Kulkami, 2014a). Algunos de ellos sugirieron que estos cambios se deben inicialmente a una relación positiva entre el número de aislamientos obtenidos y la superficie verde del órgano y luego a una disminución debida a la pérdida de nutrientes esenciales durante la maduración y senescencia de las plantas (Chapaval Pimentel *et al.*, 2006).

A su vez, los índices de diversidad utilizados (Shannon-Wiener y Simpson), los cuales consideran la riqueza y abundancia de las especies, mostraron una distribución medianamente equitativa de las especies endófitas en ambos hospedantes, con una tendencia hacia la dominancia en el último estadío fenológico evaluado y para el grano en soja. Por su parte, en los diagramas de Venn, al considerarse las especies compartidas entre el trigo y la soja, pudo observarse que las hojas y los tallos compartieron más especies en comparación con los granos y solo una especie fue compartida por los tres órganos. Interesantemente, los endófitos compartidos corresponden a especies endófitas comunes y frecuentes en diversos hospedantes (*A. alternata*, *R. rubra* y *C. herbarum*), tal como lo mencionado por Arnold (2007).

Es importante resaltar que la contrastación de los resultados obtenidos por diferentes investigadores en los estudios de diversidad de especies endófitas en un mismo hospedante resultan dificultosos, debido a que son muchos los factores que pueden influenciar su aislamiento, tales como el número de muestras analizadas, el estado nutricional y la disponibilidad de agua de las plantas, las condiciones ambientales y geográficas, del sitio del muestreo, entre otras. En este sentido, los resultados obtenidos muestran la influencia de las condiciones ambientales en las comunidades endofíticas de ambos hospedantes, por lo cual puede sugerirse que las precipitaciones, en particular, podrían influir sobre la dispersión de algunos endófitos, como por ejemplo, de especies de *Alternaria* y *C. herbarum*, quienes aumentaron notablemente sus frecuencias durante el año más húmedo. Sin embargo, otras especies parecerían ser contrariamente influenciadas por condiciones de mayor humedad ya que disminuyeron su frecuencia o no fueron registradas durante ese año como *Phoma*, *E. nigrum* y *R. rubra* en trigo, y *C. globosum* y especies diferentes de *Trichoderma* que presentaron mayores frecuencias en el año más seco en soja. En relación a estos resultados, cabe mencionar que diferentes autores han registrado diferencias en la abundancia, diversidad y composición de la microbiota endofítica en regiones tropicales versus templadas (Arnold *et al.*, 2007), el efecto de las condiciones microclimáticas como la exposición a vientos y plantas creciendo en pantanos versus en condiciones de estrés hídrico (Petrini *et al.*, 1992). Sin embargo, a la fecha este constituye el primer estudio que ha explorado el posible efecto de las precipitaciones en la composición de la microbiota endofítica en un determinado cultivo, un mismo cultivar y en un mismo sitio geográfico.

Al compararse la riqueza específica de endófitos de un cultivar de trigo y soja para un año agrícola los resultados mostraron que los órganos que presentaron los mayores valores fueron las hojas para ambos hospedantes, si bien en soja la diferencia con respecto a la riqueza de los tallos fue leve (21 y 19 para hoja y tallo, respectivamente). Además se observó una diferencia importante entre los valores de riqueza endofítica total en soja con respecto a la de trigo (32 y 17, respectivamente), que podría deberse a la diferencia de la cantidad de muestras evaluadas para cada hospedante. Esto es coincidente con diversos autores, quienes han demostrado que la cantidad de muestras tomadas para realizar los aislamientos juega un rol importante y, a su vez aseveran que el incremento en su número aumenta el número de especies aisladas (Petrini *et al.*, 1992; Gamboa *et al.*, 2002; Bayman, 2006). Por otro lado, también esto podría deberse a que en soja los porcentajes de infección por unidad de superficie fueron más altos que en trigo.

De las poblaciones endofíticas de los diferentes tejidos de trigo y soja fueron seleccionadas algunas especies para su evaluación como agentes biocontroladores de *P. tritici-repentis* y *M. phaseolina* en acuerdo con lo sugerido por diversos autores quienes destacan la importancia que reviste la adaptación ecológica de los microorganismos que se utilizan como agentes de biocontrol de los fitopatógenos (Sutton, 1995; Dal Bello *et al.*, 1997; Mónaco, 2002).

En los ensayos de evaluación de la capacidad antagonica de los endófitos de trigo frente a *Ptr* los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* mostraron que la mayoría redujo el crecimiento del patógeno ocasionando a su vez alteraciones conidiales y miceliales y reducción de la severidad de la mancha amarilla del trigo. En estas pruebas puede destacarse el efecto antagonista del endófito *T. hamatum* y de *Bacillus* sp., aunque este último mostró buen potencial biocontrolador en las pruebas *in vitro* y redujo levemente la severidad de la mancha amarilla en el bioensayo de invernáculo. Existen algunos antecedentes en los últimos años de la capacidad biocontroladora de diferentes especies endófitas aisladas de hojas, tallos y raíces de trigo pertenecientes al género *Bacillus* frente al pietín y el oídio de los cereales, registrándose sus efectos sobre la germinación de las esporas como mecanismo involucrado en el antagonismo (Liu *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2015). Por su parte, *Trichoderma* es un reconocido género fúngico con potencial biocontrolador frente a diversos fitopatógenos, que utiliza diversos mecanismos de acción como micoparasitismo, producción de antibióticos, competencia por espacio y nutrientes y la producción de enzimas (Howell, 2003; Stocco, 2014). De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, sería de interés determinar si el efecto biocontrolador de *T. hamatum* y *Bacillus* sp. frente a *Ptr* podría implicar mecanismos de competencia por espacio y/o nutrientes, micoparasitismo. y producción de sustancias antibióticas, tal como fuera demostrado para otros patosistemas.

Todas las especies endófitas de *Trichoderma* evaluadas por su potencial biocontrolador frente a *MP* redujeron el crecimiento de las colonias del patógeno en los cultivos duales, todas mejoraron el porcentaje de semillas germinadas y el largo de radícula en comparación con el testigo con *MP* y, en los bioensayos *in vivo*, si bien hubo variaciones en el efecto de algunas especies todas tuvieron buen comportamiento en la reducción de la sintomatología característica de la podredumbre carbonosa. Sin embargo, *T. harzianum*, en particular la cepa aislada en el estadio V5 fue la más efectiva en el antagonismo frente a *MP* y en la protección frente a la podredumbre carbonosa. Puede sugerirse a partir de los resultados obtenidos que las especies de *Trichoderma* pueden haber involucrado como mecanismos para el bicontrol de *MP* la competencia y el micoparasitismo.

Existen antecedentes que han demostrado el efecto inhibitorio en pruebas *in vitro* de cepas de *T. harzianum*, aisladas de suelo, en el crecimiento y la producción de microesclerocios de *MP* (Elad *et al.*, 1986), así como de inoculaciones de semillas de soja con cepas de diferentes especies de *Trichoderma*, también aisladas de suelo, que lograron proteger a las plántulas de la podredumbre carbonosa (Torrealba *et al.*, 2015).

Por lo mencionado, los endófitos evaluados como agentes de biocontrol previamente aislados de tejidos del trigo y de la soja han mostrado un efecto inhibitorio o antagónico frente a los *Ptr* y *MP*. Estos podrían estar adaptados a los tejidos de sus hospedantes y potencialmente interactuarían más estrechamente logrando gran efectividad en el biocontrol (Sutton, 1995; Dal Bello *et al.*, 1997; Mónaco, 2002).

Según los resultados promisorios obtenidos en el presente trabajo, en particular del efecto biocontrolador de *T. hamatum* frente a *Ptr* y de *T. harzianum* frente a *MP* podría sugerirse la continuidad de sus pruebas a fines de su inclusión como alternativas inocuas en el manejo integrado de la mancha amarilla del trigo y de la podredumbre carbonosa en soja. Ello constituye una herramienta interesante a los fines de limitar el daño ocasionado por el uso de productos fitosanitarios así como evitar la resistencia de patógenos a ellos. En este sentido, se ha demostrado que la combinación del uso de los biocontroladores con niveles reducidos de productos fitosanitarios, en el marco de un manejo integrado, promueve la reducción de las enfermedades de manera similar al tratamiento tradicional (Monte, 2001; Cordo *et al.*, 2012).

Asimismo, en la actualidad la gran diversidad de endófitos registrados, su rol ecológico, su habilidad para pasar de su estado endofítico a vivir fuera de la planta y sus potenciales aplicaciones, despierta un creciente interés en distintas áreas de la ciencia, tales como en los ecologistas para comprender los aspectos básicos de las asociaciones planta-hongo, en la agricultura, ya que busca la aplicación de los endófitos en programas de biocontrol para el manejo integrado de enfermedades o en el mejoramiento de especies vegetales y su adaptación a condiciones adversas, y en la obtención de mayores rendimientos, y por como orígenes de metabolitos secundarios de importancia en farmacéutica y agricultura, para los micólogos, para dilucidar los ciclos de vida de los endófitos en las plantas y, para los biólogos para el estudio de los orígenes evolucionarios, estabilidad y de las interacciones de las especies.

2. Conclusiones finales

Por lo expuesto anteriormente se puede arribar a las siguientes conclusiones:

- Las plantas de trigo y soja hospedan una gran diversidad de especies fúngicas.
- La mayoría de las especies endófitas aisladas pertenecen a diferentes clases del Phylum Ascomycota: Sordariomycetes, Dothidiomycetes, Eurotiomycetes y Leotiomycetes.
- Las comunidades endófitas del trigo y de la soja presentan una dinámica espacial, la cual fue evidenciada en las variaciones cuali-cuantitativas en los diferentes órganos analizados. Algunas especies endófitas fueron aisladas solo de un determinado órgano, lo que sugiere la “órgano-especificidad” de estos endófitos a ese microhábitat particular.
- Las especies endófitas no presentan diferencias de presencia según los cultivares de trigo, excepto para un solo órgano (glumas).
- Las comunidades endofíticas del trigo y de la soja presentan una dinámica temporal a lo largo de los ciclos fenológicos de los cultivos.
- La composición de las comunidades endofíticas del trigo y de la soja muestra variaciones según los años, los que presentan diferentes condiciones ambientales, en particular, precipitaciones y humedad ambiente.
- Los endófitos de trigo evaluados mostraron capacidad antagónica frente a *Ptr* en las pruebas *in vitro*, ocasionando la reducción del crecimiento del patógeno y/o la reducción de la severidad de la mancha amarilla al estado de plántula en la prueba *in vivo*, destacándose en particular el efecto de *T. hamatum* y *Bacillus* sp.
- Las especies endófitas de la soja evaluadas por su potencial biocontrolador frente a *MP* mostraron potencial para reducir el crecimiento del patógeno y/o reducir los síntomas de la podredumbre carbonosa en el estado de plántula, destacándose en particular el efecto de *T. harzianum* (V5).

Por lo expuesto, y dado que no existen antecedentes previos en Argentina, el presente estudio aporta al conocimiento de las comunidades endofíticas asociadas al trigo y la soja, su dinámica temporal y espacial, demostrando que ciertos endófitos aislados de estos hospedantes son efectivos en el biocontrol de la mancha amarilla y de la podredumbre carbonosa ocasionada *P. tritici-repentis* y *M. phaseolina*, respectivamente. En este sentido, se enfatiza el potencial rol de los endófitos como estrategia innovativa a considerar dentro de un manejo integrado de éstas enfermedades.

Por las consideraciones mencionadas en este estudio se determina que:

La hipótesis 1: Las plantas asintomáticas de trigo y de soja hospedan un gran número de especies fúngicas.

Se acepta.

La hipótesis 2: Los endófitos varían cuali-cuantitativamente según los distintos cultivares, órganos y estadios del ciclo fenológico del cultivo y las condiciones ambientales del sitio del cultivo.

Se acepta, excepto para las variaciones en los cultivares. Los microorganismos endófitos se ven influenciadas por las condiciones ambientales imperantes en el sitio del cultivo, dadas en las diferentes campañas.

La hipótesis 3: Determinados endófitos fúngicos tienen capacidad antagonista frente a los hongos patógenos *Pyrenophora tritici-repentis* y *Macrophomina phaseolina*.

Se acepta.

3. Futuras investigaciones

Frente a los perjuicios del uso masivo de productos fitosanitarios en el tratamiento de enfermedades de los cultivos y sus conocidas consecuencias en la salud humana y contaminación ambiental, el cambio de paradigma en la producción, el crecimiento de la población y sus requerimientos en alimentos sanos para su abastecimiento, los volúmenes requeridos de producción de cultivos por la demanda para la producción de biocombustibles, entre otros, la tendencia actual en la investigación se orienta hacia la búsqueda de alternativas inócuas para el hombre y amigables con el ambiente. Por lo mencionado y por los resultados promisorios obtenidos en este trabajo se considera que se debería continuar con estas investigaciones. En este sentido, se sugiere:

- La realización de ensayos para la evaluación de los endófitos que mostraron potencial antagonista frente *Ptr* y *MP* en condiciones de invernáculo utilizando sustrato natural (no tindalizado).
- La realización de pruebas a campo que confirmen la efectividad de la capacidad biocontroladora de los endófitos y que sean integrativas y multidisciplinarias a los efectos de un

mejor entendimiento de las condiciones bajo las cuales éstos podrían emplearse productivamente.

- La profundización en el estudio de los mecanismos involucrados por los endófitos que mostraron potencialidad en el biocontrol de *Ptr* y *MP* con la finalidad de aportar al manejo sustentable de las enfermedades que ellos ocasionan en trigo y soja.

- La aplicación de las técnicas de aislamiento a partir de tejidos asintomáticos como herramienta para la detección temprana en el campo de patógenos latentes contribuyendo al reconocimiento de los patrones de los patosistemas de importancia y en el desarrollo de efectivos métodos sustentables para su manejo.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Abawi, G.S.; Pastor-Corrales, M.A.** 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali, Colombia. CIAT. pp. 114.
- Agrios, G.N.** 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier. Academic Press. 922 pp.
- Aguaysol, N.C.; Reznikov, S.; De Lisi, V.; Gonzalez, V.; Fogliata, G.; Ploper, D.;** 2014. Sub-fases asexuales de *Macrophomina phaseolina* en el cultivo de poroto. Libro de resúmenes del 3º Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán. pp. 172.
- Alabouvette, C.; Olivain, C.; Migheli, Q.; Steinberg, C.** 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. New Phytology 184: 529-544.
- Alippi, H.E.; Carranza, J.M.** 1975. Métodos y técnicas generales fitopatológicas. En: Fitopatología. Curso Moderno. Sarasola, A.A.; Rocca de Sarasola, M.A. (Eds.) Tomo IV. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp.189-214.
- Alippi, A.M.; Perelló, A.E.; Sisterna, M.N.; Greco, N.M.; Cordo, C.** 2000. Potential of spore-forming bacteria as biocontrol agents of wheat foliar diseases under laboratory and greenhouse conditions. Zeitschrift fur Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz 107:155-169.
- Annone, J.G.** 1985. Presencia de la mancha tostada del trigo (*Helminthosporium tritici-repentis*). Carpeta de Producción Vegetal. TRIGO. TOMO VII. Inf. N° 88. EEA INTA. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. pp. 2.
- Annone, J.G.** 2006. Las principales enfermedades del trigo en Argentina: Su importancia relativa en las regiones productoras Norte y Sur. En: Actas del Congreso A Todo Trigo 2006: Nuevos conocimientos aplicados a la producción. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 53-58.
- Annone, J.G.; Gacitúa, H.; Porfiri, A.; Ivancovich, A.** 1994. Estimación del efecto de enfermedades foliares y de la espiga sobre el rendimiento mediante la comparación de tratamientos con un fungicida sistémico versus no tratados. Carpeta de Producción Vegetal. Tomo XII. Trigo. Inf. N° 156. E.E. Pergamino. INTA Buenos Aires, Argentina.
- Annone, J.G.; García, R.; Botta, G.; Ivancovich, A.** 2001. Pérdidas de rendimiento ocasionadas por la "roya de la hoja" y la "mancha amarilla" del trigo: estimaciones en el norte de la provincia de Buenos Aires. Revista de tecnología Agropecuaria 16: 21-23.
- Annone, J.G.; Kohli, M.** 1996. Principales enfermedades del trigo asociadas con la siembra directa en Argentina: Importancia y medidas de protección. En: Trabajos Presentados, IV

Congreso Nacional de Siembra Directa: Una estrategia para todos. AAPRESID. Villa Giardino, Córdoba, Argentina. pp. 135-159.

Arias, N.; Hegglin, J.P.; Ferdman, L.; Villon, C. 2005. Evaluación del efecto de la roya asiática sobre los rendimientos del cultivo de soja. En: Cultivo de Soja en el centro este de Entre Ríos. Boletín Técnico serie Producción Vegetal N° 46. INTA Ediciones. pp. 65-71.

Arnold, A.E.; Mejía, L.C.; Kyllö, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, A.E. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceeding of the National Academy of science of the United States of América. 100: 15649-15654.

Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21: 51-66.

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

Arnold, A.E.; Henk, D.A.; Eells, R.L.; Lutzoni, F.; Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. Mycologia 99: 185-206.

Arnold, A.E.; Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology 88: 541-549.

Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.; Coley, P.D.; Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology Letters 3: 267-274.

Arx, J.A. von 1974. The genera of fungi sporulating in pure cultura. 2nd rev. Ed. Vaduz. 315 pp.

Bacon, C.W.; Hinton, D.M. 2011. *Bacillus mojavensis*: its endophytic nature, the surfactins, and their role in the plant response to infection by *Fusarium verticillioides*. En: Bacteria in agrobiología: Plant growth responses. Maheshwari, D.K. (Ed.). Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 21-39.

Bacon, C.W.; Porter, J.K.; Robbins, J.D.; Luttrell, E.S. 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. Applied and Environmental Microbiology 34: 576-581.

Bacon, C.W.; White, J.F.Jr. 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. En: Microbial endophytes. Bacon, C.W.; White, J.F.Jr. (Eds.). Ed. Marcel Dekker, New York, USA. Pp. 237-261.

Bailey, B.A.; Bae, H.; Strem, M.D.; Crozier, J.; Thomas, S.E.; Samuels, G.J.; Vinyard, B.T.; Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biological Control 46: 24-35.

- Baker, K.F.; Cook, R.J.** 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman, W.H. and Company. San Francisco, California. 433 pp.
- Bannon, E.** 1978: A method of detecting *Septoria nodorum* on symptomless leaves of wheat. Iranian Journal of Agricultural Research 17: 323-325.
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B.** 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd edition, Burgess Publishing Co. 273 pp.
- Barrow, J.R.; Lucero, M.E.; Reyes-Vera, I.; Havstad, K.M.** 2008. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? Communicative and Integrative Biology 1: 69-73.
- Barrus, M. F.** 1942. Yellow spot disease of wheat in New York State. Plant Disease Report 26: 246.
- Bayman, P.** 2006. Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of tropical plants. En: Microbial ecology of aerial plant surfaces. Bailey, M.J.; Lilley, A.K.; Timms-Wilson, T.M. (Eds.). Ed. CABI. Oxfordshire, UK. pp. 37-50.
- Bell, C.R.; Dickie, G.A.; Harvey, W.L.G.; Chan, J.W.Y.F.** 1995. Endophytic bacteria in grapevine. Canadian Journal of Microbiology 41: 46-53.
- Bertoni, M.D.; Cabral, D.** 1988. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* II: Distribution of endophytes. Nova Hedwigia 46: 111-123.
- Bernstein, M.E.; Carroll, G.C.** 1977. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. Canadian Journal of Botany 55: 644-653.
- Bultman, T.L.; Murphy, J.C.** 2000. Do fungal endophytes mediate wound-induced resistance? En: Microbial endophytes. Bacon, C.W.; White, J.F. (Eds.). Ed. Marcel Dekker. New York, USA. pp. 421-455.
- Bundrett, M.C.** 2006. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. En: Schulz, B.J.E.; Boyle, C.J.C.; Sieber, T.N. (Eds.) Microbial root endophytes. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 281-293.
- Burpee, L.L.; Bouton, J.H.** 1993. Effect of eradication of the endophyte *Acremonium coenophialum* on epidemics of *Rhizoctonia* blight in tall fescue. Plant Disease 77: 157-159.
- Bussaban, B.; Lumyong, S.; Lumyong, P.; McKenzie, E.H.C.; Hyde, K.D.** 2001. Endophytic fungi from *Amonum siamense*. Canadian Journal of Microbiology 47: 1-6.
- Cabral, D.; Collantes, M.** 1992. La filosfera de *Eucalyptus viminalis* (Myrtaceae) IV: Estructura, dinámica y desarrollo de la comunidad fúngica. Boletín Sociedad Argentina de Botánica 28:123-138.

- Cabral, D.; Stone, J.K.; Carroll, G.C.** 1993. The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* 97: 367-376.
- Cabrera, M.G.; Gutiérrez, S. A.; Alvarez, R.E. Raimondo, M.R.; Gómez, D.E.** 2001. Podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), en soja sometida a estrés hídrico en el Nordeste de la Argentina. XXXIV Congreso Brasileiro y XI Congreso Latino-Americano de Fitopatología. San Pablo, Brasil.
- Calzolari, A.; Polidoro, O.; Terrile, I.** 2008. El rendimiento del trigo Argentino en las distintas subregiones trigueras. VII Congreso Nacional de Trigo, V Simposio Nacional de cereales de siembra otoño-invernal. I Encuentro del MERCOSUR Santa Rosa, La Pampa. MF 38.
- Camarena-Gutierrez, G.; de la Torre-Almaráz, R.** 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13: 157-162.
- Carmona, M.** 2005. Manual para el manejo integrado de enfermedades en trigo. II Edición. 62 pp.
- Cargo, P.D.; Ianone, L.J.; Vignale, M.V.; Scharid, C.L.; Rossi, M.S.** 2014. Species diversity of *Epichloë* symbiotic with two grasses from southern Argentinean Patagonia. *Mycologia* 106: 339-352.
- Carroll, G.C.** 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2-9.
- Carroll, G.C.** 1992. Fungal mutualism. En: *The fungal community*. Carroll, G.C.; Wicklow, D.T. (Eds.). 2° Ed. Maral, Dekker, Berlin. pp. 327-353.
- Carroll, G.C.; Carroll, F.E.** 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany* 56: 3034-3043.
- Carroll, G.C.; Petrini, O.** 1983. Patterns of substrate utilisation by some endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75: 53-63.
- Castellanos, G.; Jara, C.; Mosquera, G.** 2013. Guía Práctica 5. *Macrophomina phaseolina*. Enfermedad: Macrofomina, pudrición gris. Manejo del hongo en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 19 pp.
- Cerkauskas, R.F.; Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B.** 1983. Effect of three desiccant-type herbicides on fruiting structures of *Colletotrichum truncatum* and *Phomopsis* spp. on soybean stems. *Plant Disease* 67: 620-622.
- Chanway, C.P.** 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50:149–170.
- Chapaval Pimentel, I.; Glienke-Blanco, C.; Gabardo, J; Makowiecky Stuart, R.; Azevedo, J.L.** 2006. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.)

Merril) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 5: 705-711.

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

Clay, K.; Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 160 Suppl 4: S99-S127.

Cook, R.J.; Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogen. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. USA. 539 pp.

Coombs, J.T.; Franco, C.M.M. 2003. Isolation and Identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied of Environmental Microbiology* 69: 5603-5608.

Cordo, C.; Mónaco, C.; Segarra, C.; Simón, M.R.; Mansilla, Y.A.; Perelló, A.; Kripelz, N.; Bayo, D.; Conde, R.D. 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 687-698.

Cordo, C.; Simón, M.R.; Stocco, M.; Lampugnani, G.; Abramoff, C.; Kripelz, N.; Mónaco, C. 2012 Aplicaciones de *Trichoderma harzianum* y su efecto sobre las curvas de progreso de la Septorios del trigo y el rendimiento. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Potrero de los Funes. San Luis. pp. 153.

Couterot, L.; Ivancovich, A. 2009. Taller de diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. Programa Nacional de Roya de la Soja. E.E.A. Pergamino, INTA. pp. 5-10.

Crous, P.W.; Petrini, O.; Marais, G.F.; Pretorius, Z.A.; Rehder, F. 1995. Occurrence of fungal endophytes in cultivars of *Triticum aestivum* in South Africa. *Micoscience* 36: 105-111.

Crowder, D.W.; Jabbour, R. 2014. Relationships between biodiversity and biological control in agroecosystems: Current status and future challenges. *Biological Control* 75: 8-17.

Dalal, J.M.; Kulkarni, N.S. 2014a. Population variance and diversity of endophytic fungi in soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *Journal of Botanical Sciences* 3: 33-39.

Dalal, J.M.; Kulkarni, N.S. 2015. Effect of endophytic treatments on plant growth performance and disease incidences in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivar JS-335 against challenge inoculation with *R. solani*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 10: 99-110.

Dalal, J.M., Kulkarni, N.S.; Bodhankar, M.G. 2014. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic fungi of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Indian Journal of Advances in Plant Research* 1: 9-16.

Dal Bello; G.; Mónaco, C. 2014. Manejo de enfermedades con agentes biocontroladores. En: *Enfermedades de trigo: Avances científicos en la Argentina*. Cordo, C. y Sisterna. M. Coords. Ed. Edulp. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 401-420.

- Dal Bello, G.; Mónaco, C.; Chaves, R.** 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 131-134.
- De Bary, A.** 1886. *Über einige Sclerotien und Sclerotienkrankheiten*. *Botanische Zeitung*: 377-474.
- Dennis, C.; Webster, J.** 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of non-volatile antibiotics. *Transaction of British Mycological Society* 57: 41-48.
- Dickinson, C.H.; Boardman, F.** 1971. Physiological studies of some fungi isolated from peat. *Transaction of British Mycological Society* 55: 293-305.
- Dingle, J.; McGee, P.A.** 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research* 107: 310-316.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo C.W.** InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Distéfano de Vallone, S.; Giorda L.M. (Eds.)** 1997. Enfermedades de la soja en la Argentina. Agro 1 de Córdoba. EEA Marcos Juárez-EEA Manfredi. INTA Centro Regional Córdoba. 72 pp.
- Dolatabadi, H.K.; Goltapeh, E.M.; Mohammadi, N.; Rabiey, M.; Rohani, N.; Varma, A.** 2012. Biocontrol potential of root endophytic fungi and *Trichoderma* species against Fusarium wilt of lentil under *in vitro* and greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Science and Technology* 14:407-420.
- Doty, S.L.** 2013. Endophytic yeasts: Biology and applications. En: *Symbiotic endophytes*. *Soil Biology* 31. Aroca, R. (Ed.). Ed. Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, Alemania. pp. 335-343.
- Elad, Y.** 1996. Bacterial and fungal cell-wall hydrolytic enzymes en relation to biological control of *Rhizoctonia solani*. En: *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S.; Dijst, G. (Eds.). Ed. Springer Science & Business Media, B.V. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp. 455-462.
- Elad, Y.; Zvieli, Y.; Chet, I.** 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection* 4: 288-292.
- Ellis, M.B.** 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, UK. 608 pp.
- Ellis, M.B.** 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. CAB International Mycological Institute, Kew, UK. 507 pp.
- Ellis, M.B.; Waller, J.W.** 1976. *Pyrenophora tritici-repentis*. Commonwealth Mycological Institute (Great Britain) (CMI). C.A.B. International. Description of pathogenic fungi and bacteria N° 494.

- Espinosa-García, F.J.; Langenheim, J.H.** 1990. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population-diversity and spatial patterns. *New Phytologist* 116: 89-97.
- Fálico, L.; Visintín, G.; García, B.; Alcaraz, E.** 2007. Implantación de soja con microorganismos biocontroladores. *Ciencia, docencia y Tecnología* N° 35. Entre Ríos. Argentina.
- Fehr, W.R.; Caviness, C.E.** 1977. Stages of soybeans development. Iowa State University Special Report 80. pp. 11.
- Ferlini, H.; Díaz, S.C.; Traut, C.O.** 2005. Inoculación con *Azospirillum* en cultivo de alfalfa Ensayos a campo. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Resumen A 060.
- Fisher, P.J.; Anson, A.E.; Petrini, O.** 1986. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex galli*. *Transaction of the British Micological Society* 86: 153-156.
- Fisher, P.J.; Graf, F.; Petrini, L.E.; Sutton, B.C.; Wookey, P.A.** 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic semidesert and from the Swiss alps. *Mycologia* 87: 319–323.
- Fisher, P.J.; Petrini, O.; Webster, J.** 1991. Aquatic hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots of *Alnus glutinosa* *Mycological Research* 95: 543-547.
- Formento, A.N.; de Souza, J.; Zanotti, F.** 2009. Comportamiento de cultivares de soja a mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) en Entre Ríos. Ciclo agrícola 2008/09. INTA-EEA Paraná. Actualización Técnica Soja. Serie Extensión 56: 46-49.
- Formento, N.; Schutt de Varini, L.** 2009. Hongos endofíticos en maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*) y soja (*Glycine max*). XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santiago del Estero, Argentina. E- 038.
- Freeman, S.; Minz, D.; Kolesnik, I.; Barbul, O.; Zveibil, A.; Maymon, M.; Nitzani, Y.; Kirshner, B.; Rav-David, D.; Bilu, A. Dag, A.; Shafir, S.; Elad, Y.** 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110: 361–370.
- Fröhlich, J.; Hyde, K.D.; Petrini, O.** 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104: 1202-1212.
- Gaiero, J.R.; McCall, C.A.; Thompson, K.A.; Best, A.S.; Dunfield, K.E.** 2013. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100: 1738-50.
- Gally, M.** 2003. Enfermedades de fin de ciclo de la soja en la región pampeana. Manejo integrado de enfermedades en cultivos extensivos. Jornadas Técnicas. Buenos Aires. Argentina. pp. 77-80.

- Gamboa, M.A.; Laureano, S.; Bayman, P.** 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia* 156: 41-45.
- Gasoni, L.; Stegman de Gurfinkel, B.** 1997. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research* 101: 867-870.
- Gilchrist, L.; Fuentes, S.F.; Isla de Bauer de la M.L.** 1984. Determinación de fuentes de resistencia contra *Helminthosporium tritici-repentis* bajo condiciones de campo y de invernáculo. *Agrociencia* 56: 95-106.
- Gindrat, D.; Pezet, R.** 1994. Le paraquat, un outil pour la révélation rapide d'infections fongiques latentes et de champignons endophytes. *Journal of Phytopathology* 141: 86-98.
- Gond, S.K.; Verma, V.C.; Mishra, A. Kumar, A.; Kharwar, R.N.** 2010. Role of fungal endophytes in plant protection. En: Management of fungal plant pathogens. Arya, A.; Perelló, A. (Eds.). Ed. CAB International. pp. 183-197.
- Gyaurgieva, O.H.; Bogomolova, T.S.; Gorshkova, G.I.** 1996. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an HIV-infected patient. *J. Med. Vet. Mycol.* 34: 357-359.
- Hadar, Y.; Chet, I.; Henis, Y.** 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69: 64-68.
- Hallman, J.; Sikora, R.A.** 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102: 155-162.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffe, W.F.; Kloepper, J.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Harman, G.E.; Howel, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.** 2004. *Trichoderma* spp. opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review* 2: 43-56.
- Hosford, R.M. Jr.** 1981. Tan spot. En: Hosford, R.M. Jr. (Ed.). Tan spot of wheat and related disease workshop, North Dakota, State University, Fargo, USA. pp. 1-24.
- Hosford, R.M. Jr.; Busch, R.H.** 1974. Losses in wheat caused by *Pyrenophora trichostoma* and *Leptosphaeria avenaria* f. sp. *triticea*. *Phytopathology* 64: 184-187.
- Howell, C.R.** 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Hurek, T.B.; Reinhold-Hurek, B.; Montagu, M.B.; Kellenberger, E.** 1994. Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* 176: 1913-1923.

- Iannone, L.J.; Pinget, A.D.; Nagabhyru, P.; Schardl, C.L.; DE Battista, J.P.** 2012a. Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grasse. *Grass Forage Science* 67: 382-390.
- Iannone, L.J.; Novas, M.V.; Young, C.A.; De Battista, J.P.; Schardl, C.L.** 2012b. Endophytes of natives grasses from South America: biodiversity and ecology. *Fungal ecology* 5: 357-363.
- Impullitti, A.E.; Malvick, D.K.** 2013. Fungal endophyte diversity in soybean. *Journal of Applied Microbiology* 5:1500-1506.
- Inbar, J.; Menendez, A.; Chet, I.** 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology* 28: 757-763.
- Istifadah, N.; McGee, P.A.** 2006. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology* 35: 411-418.
- Istifadah, N.; Saleeba, J.A.; Mc. Gee, P.A.** 2006. Isolation of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 84: 1148-1155.
- Ivancovich, A.** 2011. Diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. E.E. Pergamino, INTA, Buenos Aires, Argentina. 96 pp.
- Kloepper, J.W.; Ryu, C.M.; Zhang, S.** 2004. Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
- Kobayashi, D. Y.; Palumbo, J. D.** 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agricultura. En: Bacon, C.W., White, J.F. (Eds.). *Microbial endophytes*. Ed. Marcel Dekker, New York. USA. pp. 199-233.
- Kuldau, G.; Bacon, C.** 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control* 46: 57-7.
- Lanteri, L.** 2008. Respuesta a precios del área sembrada de soja en la Argentina. En: *Ensayos económicos*. Banco Central de la República Argentina. pp. 57-86.
- Larran, S.; Mónaco, C.; Alippi, H.E.** 2000. Endophytic fungi in beet (*Beta vulgaris* var. *esculenta* L.) leaves. *Advances in Horticultural Science* 14: 193-196.
- Larran, S.; Mónaco, C.; Alippi, H.E.** 2001. Endophytic fungi from tomato plants. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 17: 181-184.
- Larran, S.; Perelló, A.; Simón M.R.; Moreno, V.** 2002a. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 683-686.

- Larran, S.; Perelló, A.; Simón M.R.; Moreno, V.** 2007. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 565-572.
- Larran, S.; Rollán, C.; Bruno Angeles, H.; Alippi, H.E.; Urrutia, M.I.** 2002b. Endophytic fungi in healthy soybeans leaves. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 17: 173-178.
- Larran, S.; Simón, M.R.; Moreno, V.; Santamarina, M.P.; Perelló, A.** 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot. *Biological Control* 92: 17-23.
- Lee, K.; Pan, J.J.; May, G.** 2009. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maíz. *FEMS Microbiology Letters* 299: 31-37.
- Leuchtmann, A.; Bacon, C.W.; Scharld, C.; White, W.J.F.Jr.; Tadych, M.** 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106: 202–215. DOI: 10.3852/13-25.
- Leslie, J.F.; Summerell, B.A.** 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, USA. 388 pp.
- Li, B.C.; Sutton, J.C.** 1995. Evaluation of leaf-associated microorganisms for biocontrol of tan spot in wheat foliage. *Fitopatologia Brasileira* 20: 545-552.
- Li, J.Y.; Strobel, G.A.; Harper, J.K.; Lobkovsky, E.; Clardy, J.** 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Organic Letters* 2: 767-770.
- Li, C.; Nan, Z.; Paul, V.H.; Dapprich, P.; Liu, Y.** 2004. A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China. *Mycotaxon* 90:141-147.
- Li, H.-Y.; Wei, D.-Q.; Shen, M.; Zhou, Z.-P.** 2012. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity* 54: 11-18.
- Lifshitz, R.; Windhan, M.T.; Baker, R.** 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 720-725.
- Liu, B.; Qiao, H.; Huang, L.; Buchenauer, H.; Han, Q.; Kang, Z.; Gong, Y.** 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49: 277-285.
- Luck, J.; Spackman, M.; Freeman, A.; Trebicki, P.; Griffith, W.; Finlay, K.; Chakraborty, S.** 2011. Climate change and diseases of food crops. *Plant Pathology* 60: 113-121.
- Luginbühl, H.L.; Müller, E.** 1980. Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von vier gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). *Sydowia* 33: 185-209.

Luginbühl, H.L.; Petrini, O.; Müller, E. 1979: Funghi endofitici nel frumento (*Triticum vulgare* Vill.). *Phytopathologia Mediterranea* 18: 192-194.

Manamgoda, D. S.; Cai, L.; McKenzie, E.H.C.; Crous, P.W.; Madrid, H.; Chukeatirote, E.; Shivas, R.G.; Tan, Y.P.; Hyde, K.D. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56:131–144.

Manamgoda, D. S.; Rossman, A.Y.; Castlebury, L.A.; Crous, P.W.; Madrid, H.; Chukeatirote, E.; Hyde, K.D. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221–288.

Marshall, D.; Tunalı, B.; Nelson, L.R. 1999. Occurrence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. *Crop Science* 39: 1507-1512.

Martínez, B., Infantel, D.; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal* 1: 1-11.

Marquez-Santacruz, H.A.; Hernandez-Leon, R.; Orozco-Mosqueda, M.C.; Velazquez-Sepulveda, I.; Santoyo, G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*. 9: 2372-2380.

McInroy, J.A.; Kloepper, J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-342.

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

Melo, Y. 1991. Potencialidade da utilização de *Trichoderma* spp., no controle biológico de doenças de plantas. En: *Controle biológico de doenças de plantas*. Bettiol, W., (Org.) Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA Documentos. 15). pp. 135-156

Melo Reis, E.; Carmona, M. 1995. Mancha amarilla de la hoja del trigo. Bayer. 14 pp.

Mengistu, A.; Wrather, A.; Rupe, J.C. 2015. Charcoal rot. Parte I. Infectious diseases. Diseases of lower stems and roots. En: *Compendium of soybean disease and pest*. Hartman, G.L.; Rupe, J.C.; Sikora, E.J.; Domier, L.L.; Davis, J.A.; Steffy, K.L. (Eds.) Fifth edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. U.S.A. pp. 67-69.

Miller, W.; Roy, K.W. 1982. Mycoflora of soybean leaves, pods, and seeds in Mississippi. *Canadian Journal of Botany* 60: 2716-2723.

Mónaco, C. 2002. Posibilidades del manejo de enfermedades mediante el uso de antagonistas. En: *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*. Sarandón, S. (Ed.), Argentina. pp. 309-318.

- Monte E.** 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4: 1-4.
- Moreno, M.V.** 2014. Mancha amarilla del trigo. En: Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina. Cordo, C.A. Coordinado por Cordo, C.A.; Sisterna, M.N. EDULP. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 163-173.
- Muñoz, R.** 2012. Economía y mercado de la soja en Argentina. En: El cultivo de soja en Argentina. Baigorri, H.E.J.; Salado Navarro, D.L.R. Agroeditorial. Vicente López, Buenos Aires, Argentina. pp. 51-82.
- Narisawa, K.; Kawamata, H.; Currah, R.S.; Hashiba, T.** 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology* 108: 103-109.
- Newman, L.A.; Reynolds, C.M.** 2005. Phytoremediation and bacteria: New uses of endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology* 23: 6-8.
- Odum, E.** 1974. Ecología. 3ra Edición. Editorial Interamericana, México. 639 pp.
- Orole, O.O.; Adejumo, T.O.** 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 3: 969-973.
- Pereira, J.O.; Carneiro, M.L.; Acevedo, J.L.** 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 37-40.
- Perelló, A.; Dal Bello, G.G.M.** 2011. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biological inducers under field conditions. *Annals of Applied Biology* 158: 267-274.
- Perelló, A.; Mónaco, C.** 2007. Status and progress of biological control of foliar diseases of wheat in Argentina. En: Seed borne diseases: Ecofriendly management. Arya, A.; Mónaco, C. (Eds.). Kumar, Pawan Scientific Publishers, Jodhpur, India. pp. 283-321.
- Perelló, A.; Mónaco, C.; Moreno, M.V.; Cordo, C.; Simón, M.R.** 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Science and Technology* 16: 803-813.
- Perelló, A.; Mónaco, C.; Simón, M.R.; Sisterna, M.; Dal Bello, G.** 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan sport of wheat in Argentina. *Crop Protection* 22: 1099-1106.
- Perelló, A.; Moreno, V.** 2006. Ocurrencia de *Cephalosporium gramineum* en trigo en la Argentina. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Catamarca, Argentina. Actas 270-271.

- Perelló, A.; Moreno, V.; Mónaco, C.; Simón, M.R.; Cordo, C.** 2009. Biocontrol of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* sp. under field conditions in Argentina. *Biocontrol* 54: 113-122.
- Perelló, A.; Simón, M.R.; Arambarri, A.; Cordo, C.** 2001. Greenhouse screening of the saprophytic resident microflora for control of leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Phytoparasitica* 29: 341-351.
- Perez, C.A.; Rojas, S.J.; Vale, M.H.** 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 2: 286-301.
- Petrini, O.** 1991. Fungal endophytes of tree leaves. En: *Microbial ecology of leaves*. Andrews, J.A.; Hirano, S.S. (Eds.). Springer Verlag, New York, U.S.A. pp. 179-197.
- Petrini, O.** 1996. Ecological and physiological aspect of host-specificity in endophytic fungi. En: *Endophytic Fungi of grasses and woody plants*. Redlin, S.C.; Carris, L.M. (Eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pp. 87-100.
- Petrini, O.; Fisher, P.J.** 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transaction of the British Mycological Society* 91: 233-238.
- Petrini, O.; Müller, E.; Luginbühl, M.** 1979. Fungi endophytic in higher plants. *Naturwissenschaften* 66: 262-263.
- Petrini, O.; Stone, J.; Carroll, F.E.** 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany* 60: 789-796.
- Petrini, O.; Sieber, T.N.; Viret, O.** 1992. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1: 185-196.
- Pillay, V.K.; Nowak, J.** 1997. Inoculum density, temperature and genotype effects on epiphytic and endophytic colonization and *in vitro* growth promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 354-361.
- Pineda P., J.B.; Gonnella E.** 1988. Evaluación del control biológico de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Agronomía Tropical* 38: 43-48.
- Pleban, S.; Ingel, F.; Chet, I.** 1995. Control de *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* by use of endophytic bacteria (*Bacillus* spp.). *European Journal of Plant Pathology* 101: 665-672.
- Ploper, L.D.** 2015. Soybean disease in Argentina. En: *Compendium of soybean disease and pest*. Hartman, G.L.; Rupe, J.C.; Sikora, E.J.; Domier, L.L.; Davis, J.A.; Steffy, K.L. (Eds.) Fifth edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. pp. 5-7.

- Ploper, L.D.; González, V.; V. De Ramallo, N.; Gálvez, R.; Devani, M.** 2001. Presencia de la podredumbre carbonosa del tallo de la soja en el centro y noroeste argentino. *Avance agroindustrial*. 22: 30-34.
- Ploper, L.D.; Scandiani, M.M.** 2009. Visión general de las enfermedades radicales de la soja en Argentina. Overview of soybean root diseases in Argentina. V Congresso Brasileiro de Soja. Goiania, Brasil.
- Porras-Alfaro, A.; Bayman, P.** 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 40: 291-315.
- Porter, C.L.** 1924. Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *American Journal of Botany* 11: 168-188.
- Prompttha, I.; Lumyong, S.; Dhanasekaran, V.; Hugel, E.; McKenzie, C.; Hyde, K.D.; Jeewon, R.** 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53: 579-590.
- Quadt-Hallman, A.; Benhamou, N.; Kloepper, J.W.** 1997a Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 577-582.
- Quadt-Hallman, A.; Hallman, J.; Kloepper, J.W.** 1997b Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 254-259.
- Rajaran, S.** 1999. Historical aspects and future challenges of an international wheat program. En: van Ginkel, M.; McNab, A.; Krupinsky, J. (Eds.) *Septoria and Stagonospora diseases cereals. A compilation of global research*. CIMMYT, México. pp. 1-17.
- Rajaram, S.** 2001. Prospects and promise of wheat breeding in the 21st century. *Euphytica* 119: 3-15.
- Rees, L.G.; Platz, G.J.** 1979. The occurrence and control of yellow spot of wheat in North-Eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 19: 369-372.
- Rees, L.G.; Platz, G.J.; Mayer, R.J.** 1982. Yield losses in wheat from yellow spot: comparison of estimates derived from single tillers and plots. *Australasian Journal of Agricultural Research* 33: 899-908.
- Rees, R.G.; Platz, G.J.** 1992. Tan spot and its control - some Australian experiences. En: *Advances in tan spot research*. Francl, L.J.; Krupinsky, J.M.; McMullen, M.P. (Eds). NDSU Agricultural Experiment Station Publications. pp. 1-15.
- Reis, E.M.; Trezzi Casa, R.; Carmona, M.** 2002. Elementos para el Manejo de enfermedades. Pp. 275-308 En: *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*. Sarandon, S. (Ed.). Ediciones Científicas Armericanas.

- Reznicov, S.; De Lisi, V.; Stegmayer, C.A.; Jalil, A.C.; Alarcon, P.; Martínez, M.J.; González, V.; Vellicce, G.; Castagnaro, A.P.; Plopper, L.D.** 2013. Publicación Especial N° 47. INTA. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán. Argentina.
- Rodríguez, M.A.; Lo, T.E.; Pérgola, M.; Godeas, A.M.** 2008. Hongos endofitos septados oscuros (hongos DSE): evaluación de la capacidad antagónica frente a fitopatógenos de raíz. VI Congreso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata, Argentina.
- Rodríguez, R.J.; White, Jr. J.F.; Arnold, A. E.; Redman, R.S.** 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.
- Rossi, R.** 2012. Historia del mejoramiento genético de la soja en Argentina. En: El cultivo de soja en Argentina. Baigorri, H.E.J.; Salado Navarro, D.L.R. Agroeditorial. Vicente López, Buenos Aires, Argentina. pp. 33-50.
- Ryan, R.P.; Germaine, K.; Franks, A.; Ryan, D.J., Dowling, D.N.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.
- Samuels, G.J.** 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96: 195-206.
- Sarova, J.; Hanzalova, N.; Barlos, P.** 2002. *Pyrenophora tritici-repentis* one the most important leaf spot pathogens in the Czech Republic. 4th International wheat tan spot and spot blotch workshop. Bemidji, M.N., North Dakota, State University. U.S.A.
- Satorre, E.H.; Benech Arnold, R.L.; Slafer, G.A.; de la Fuente, E.B.; Miralles, J.D.; Otegui, M.E.; Savin, R.** 2010. Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. pp. 783.
- Schulz, B.; Boyle, C.** 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Schulz, B.; Rommert, A.-K.; Dammann, U.; Aust, H.-J.; Strack, D.** 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* 103: 1275-1283.
- Sieber, T.N.** 1989. Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and White fir. *Mycological Research* 92: 322-326.
- Sieber, T.; Riesen, T.K.; Muller, E.; Fried, P.M.** 1988. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. and germ.=*Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of Phytopathology* 122: 289-306.
- Sieber, T.N.; Sieber-Canavesi, F.; Petrini, O.; Ekramoddoullah, A.K.; Dorworth, C.E.** 1991. Characterization of canadian and European melanconium from some *Alnus* spp. by morphological cultural and biochemical studies. *Canadian Journal of Botany* 69: 2170-2176.
- Sillón, M.** 2012. Enfermedades del cultivo de soja. Pp. 303-316. En: El cultivo de soja en Argentina. Baigorri, H.E.J.; Salado Navarro, D.L.R. Vicente López, Agroeditorial. 400 pp.

- Sim, T.; Willis, W.G.** 1982. Kansas wheat disease losses. Kansas State Board of Agriculture. Topeka. 4 pp.
- Simón M.R.** 2007. Manejo integrado de enfermedades foliares fúngicas en trigo. Jornadas de actualización en enfermedades de trigo. Instituto Fitotécnico Santa Catalina. UNLP. pp. 40-45.
- Simón, M.R.; Ayala, F.M.; Golik, S.I.; Terrile, I.I.; Cordo, C.A.; Perelló, A.E.** 2011. Integrated foliar disease management to prevent yield loss in Argentinian wheat production. *Agronomy Journal* 103: 1441-1451.
- Simmons, E.G.** 2007. *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Sinclair, J.B.** 1991. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease* 75: 220-224.
- Sinclair, J.B.; Backman, P.S.** (Eds.) 1989. Compendium of soybean diseases. 3rd ed. APS Press. American Phytopathological Society. St. Paul. MN. EE.UU. 106 pp.
- Sinevanesan, A.** 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and other teleomorphs. *Mycological Papers* N° 158. CAB International Micological Institute. England. 261 pp.
- Spurr, H.W. JR.; Welty, R.E.** 1975. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 65: 417-422
- Srivastava, A. K., Arora, D. K., Gupta, S., Pandey, R. R. and Lee, M. W.** 1996. Diversity of potential microbial parasites colonizing sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22: 1-2.
- Srivastava, A.K.; Singh, T.; Jana, T.K.; Arora, D.K.** 2001. Microbial colonization of *Macrophomina phaseolina* and suppression of charcoal rot of chickpea. En: *Microbes and plants*. Sinha, A. (Ed.). Vedams eBooks Ltd., New Delhi, India. pp. 269-319.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.** 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260: 214-216.
- Stocco, M.C.** 2014. Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.
- Stone, J.K.; Bacon, C.W.; White, Jr. J.F.** 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En: *Microbial Endophytes*. Bacon, C.W.; White, J.F.Jr. (Eds.). Marcel Dekker. New York, U.S.A. Pp. 3-29.

- Stone, J.K.; Petrini, O.** 1997. Endophytes of forest trees: A model for fungus-plant interactions. En: The mycota. V. Part. B. Plant relationships. Carroll, G.C.; Tudzynski, P. (Eds.). Springer Verlag, Berlin. Alemania. pp. 129-140.
- Stone, J.K.; Polishook, J.D.; White, J.F. Jr.** 2004. Endophytic fungi. En: Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods Mueller, G.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. (Eds.). Elsevier Academic Press. USA. Pp. 241-270.
- Stone, J. K.; Viret, O.; Petrini, O.; Chapela, I.** 1994. Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi. En: Host wall alterations by parasitic Fungi. Petrini, O.; Ouellette, G.B. (Eds.). American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. U.S.A. Pp. 115-128.
- Strobel, G.; Daisy, B.** 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 491-502.
- Sturz, A.V.** 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. Plant Soil 175: 257-263.
- Sturz, A.V.; Christie, B.R.; Matheson, B.G.** 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. Canadian Journal of Microbiology 44: 162-167.
- Sumarah, M.W.; Puniani, E.; Sorensen, D.; Blackwell, B.A.; Miller, J.D.** 2010. Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens* Phytochemistry 71: 760-765.
- Sutton, B.C.** 1980. The coelomycetes. Fungi imperfecti with picnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 pp.
- Sutton, J.** 1995. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. Advances in Plant Pathology 11:173–190.
- Tao, A.; Pang, F.; Huang, S.; Yu, G.; Li, B.; Wang, T.** 2014. Characterisation of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. Biocontrol Science and Technology 24: 901-924.
- Tejesvi, M.V.; Mahesh, B.; Nalini, M.S.; Prakash, H.S.; Kini, K.R. Subbiah, V.; Shetty, H.S.** 2005. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 1535-1540.
- Tekauz, A.** 1976. Distribution, severity and relative importance of leaf spot diseases wheat in Western Canada en 1974. Canadian Plant Disease Survey 56: 36-40.

- Tian, X.L.; Cao, L.X.; Tan, H.M.; Zeng, Q.G.; Jial, Y.Y.; Han, W.Q.; Zhou, S.N.** 2004 Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 20: 303-309.
- Tintjer, T.; Rudgers, J.A.** 2006. Grass–herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. *New Phytologist* 3: 513-521.
- Torrealba, J.A.; Pineda, J.; Ulacio, D.; Escalante, H.; Hernández, A.** 2015. La pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*) en soya y su manejo mediante aplicaciones de *Trichoderma* spp. y *Rhizobium* sp. *Bioagro* (Universidad Centroccidental L. Alvarado, Baquisimeto, Venezuela) 27: 159-166.
- Vallone S.; Salines L.; Gadban L.; Masiero, B.** 2003. Comparación de la acción de una estrobirulina y un bencimidazol en distintos estadios fenológicos para el control de enfermedades de fin de ciclo. Campaña 2002/2003. Soja Actualización 2003. Información para extensión N° 81. INTA Marcos Juárez. Buenos Aires, Argentina.
- Vilich, V.; Dolfen, M.; Sikora, R.A.** 1998. *Chaetomium* spp. colonization of barley following seed treatment and its effect on plant growth and *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* disease severity. *Z Pflanzenkrank Pflanzensch* 105:130-139.
- Vignale, M.V.; Astiz-Gassó, M.M.; Novas, M.V.; Iannone, L.J.** 2013. Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). *Biological Control* 67: 1-7.
- Vinale, F.; Sivasithamparamb, K.; Ghisalberti, E.; Marra, R.; Woo, S.; Lorito, M.** 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Walcott, R.R.; Mc Gee, D.C.; Misra, M.K.** 1998. Detection of asymptomatic fungal infections of soybean seeds by ultrasound analysis. *Plant Disease* 82: 584-589.
- Washington, W.S.; Stewart-Wade, S.; Hood, V.** 1999. *Phomopsis castanea*, a seedborne endophyte in chestnut trees. *Australian Journal of Botany* 47: 77-84.
- Webber, J.** 1981. A natural control of Dutch elm disease. *Nature* 292: 449-451.
- White, J.F. Jr.** 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A Proposal concerning origin and evolution. *Mycología* 80: 442-446.
- White, J.F. Jr.; Reddy, P.B.; Bacon, C.W.** 2000. Biotrophic endophytes of grasses: A sistemyc appraisal. En: *Microbial endophytes*. Bacon, C.W.; White, J.F. Jr. (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 49-62.
- Wille, P.A.; Aeschbacher, R.A.; Boller, T.** 1999. Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected host grasses. *Plant Journal* 18: 349–358.

Wright, E.; Sutton, J.C. 1990. Inoculum of *Pyrenophora tritici-repentis* in relation to epidemics of tan spot of winter wheat in Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology 12: 149-157.

Woudenberg, J.H.C.; Groenewald, J.Z.; Binder, M.; Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. Studies in Mycology 75: 171–212.

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

Zabalgoitia, I. 2008. Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. Spanish Journal of Agricultural Research 6: 138-146.

Zadoks, J.C.; Chang, T.T.; Konzak, K. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research 14: 415-421.

Zhang, Y.Z.; Chen, W.F.; Li, M.; Sui, X.H.; Liu, H.-C.; Zhang, X.X.; Xin, Chen, W.X. 2012. *Bacillus endoradicis* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from soybean root. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62: 359–363.

Zillinsky, F.J. 1984. Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño: una guía para su identificación. CIMMYT. El Batán, México. 141 pp.

Zinniel, D.K.; Lambrecht, P.; Harris, N.B.; Feng, Z.; Kuczmarski, D.; Higley, P.; Ishimaru, C.A.; Arunakumari, A.; Barletta, R.G.; Vidaver, A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 2198-2208.

Zou, W.X.; Meng, J.C.; Lu, H.; Chen, G.X.; Zhang, T.Y.; Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisa mongolica*. Journal of Natural Products 63: 1529-1530.

Fuentes electrónicas *on line*

Barberis, N.A. 2014. Evolución y perspectiva mundial y nacional de la producción y el comercio de trigo. Cartilla Digital Manfredi. Ediciones INTA. EEA Manfredi. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_evolucion_y_perspectiva_mundial_y_nacional_de_la_.pdf (último acceso: diciembre 2015).

Bolsa de Comercio de Rosario (BCR) <http://www.bcr.com.ar> (último acceso: marzo de 2016).

Cámara Argentina de Biocombustibles (CARBIO). http://www.carbio.com.ar/es/?con=bio_estadisticas (último ingreso marzo de 2016).

- Carretero R.** 2010. Enfermedades foliares del trigo: Entender cómo funciona el sistema cultivo-enfermedad. Agroconsultas online, 4453, 1–7. [http://www.agroconsultasonline.com.ar/documento.html/Enfermedades%20foliares%20del%20cultivo%20de%20trigo%3A%20Entender%20c%C3%B3mo%20funciona%20el%20sistema%20cultivo-enfermedad,%20puede%20ayudar%20a%20tomar%20mejores%20decisiones%20de%20control%3F%20\(2012\).pdf?op=d&documento_id=363](http://www.agroconsultasonline.com.ar/documento.html/Enfermedades%20foliares%20del%20cultivo%20de%20trigo%3A%20Entender%20c%C3%B3mo%20funciona%20el%20sistema%20cultivo-enfermedad,%20puede%20ayudar%20a%20tomar%20mejores%20decisiones%20de%20control%3F%20(2012).pdf?op=d&documento_id=363) (último acceso: abril de 2016).
- Dalal, J.M.; Kulkarni, N.S.** 2014b. Antagonistic and plant growth promoting potential of indigenous endophytic actinomycetes of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). CIBTech Journal of Microbiology. <http://www.cibtech.org/J-Microbiology/PUBLICATIONS/2014/Vol-3-No-4/01-CJM-001-JITENDRA-ANTAGONISTIC-SOYBEAN.pdf> (último acceso: abril de 2016).
- Distéfano, S.G.; Gadbán, L.C.** 2010. Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2008–2009. Agrolluvia.com. Panorama informativo para el productor agropecuario. 6 pp. <http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/06/Panorama-fitopatol%C3%B3gico-del-cultivo-de-soja-en-la-campa%C3%B1a-2008-2009.pdf> (último acceso: noviembre de 2016).
- Ezziyyani, M.; Sid Ahmed, A.; Pérez Sánchez, C.; Requena, M.E.; Candela, M.E.** 2006. Control biológico por organismos antagonistas. http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh191/08_15.pdf (último acceso: noviembre de 2015).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)** <http://www.fao.org> (último acceso: diciembre de 2015). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm>
- Formento, N.** 2005. Enfermedades de fin de ciclo de la Soja en Entre Ríos. En: Control de enfermedades en el cultivo de soja. Arias, N.; Andrian, M. Informe INTA EEA Concepción del Uruguay. <http://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-control-de-enfermedades-soja.pdf> (último acceso: octubre 2015).
- Formento, N.; de Souza, J.; Velázquez, J.C.** 2007. Pérdidas del rendimiento por mancha amarilla del trigo (*Pyrenophora tritici-repentis*, anamorfo: *Drechslera tritici-repentis*). Resultados preliminares. En: Evaluación de productos curasemillas para el control de mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis*) en trigo. Alberione, E.; Bainotti, C.; Frascina, J.; Salines, J.; Donaire, G.; Arburua, M.; Rosso, D. EEA INTA Marcos Juárez.

http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-evaluacin_de_productos_curasemillas.pdf
(último acceso: diciembre de 2015).

Gao, X.; Gong, Y.; Huo, Y.; Han, Q.; Kang, Z.; Huang, L. 2015. Endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-J is a promising biocontrol agent for wheat powdery mildew. *BioMed Research International* Volume 2015. Article ID 462645, 8 pp.
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/462645> (último acceso: febrero 2016)

Gomes Fernandes, E.; Liparini Pereira, O.; Cândido da Silva, C.; Braga Pereira Bento, C.; Vieira de Queiroz, M. 2015. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiology Research* 181: 84-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010> (último acceso: febrero 2016).

Higgins, K.L.; Arnold, A.E.; Miadlikowska, J.; Sarvate, S.D.; Lutzoni, F. 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 543-555.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005421> (último acceso: septiembre 2015).

Impullitti, A.E. 2012. Endophytic fungi as a biological control agent for soybean (*Glycine max* L. Merr) Pathogens - *ResearchGate*. Conference paper.
<http://www.researchgate.net/publication/267880245> (último acceso: octubre de 2015).

Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24. N° 1.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext (último acceso: enero de 2016).

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce. 2011. Ensayos a campo de la campaña 2009/2010 y ensayos en condiciones controladas en Argentina. Informe Final Curso BiotecSojaSur Paraguay. Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de la soja. Una experiencia de colaboración en el Mercosur. Bella Vista, Itapúa. Paraguay.
http://www.inbio.org.py/uploads/Curso_BiotecSojaSur_Py_Parte_3.pdf (último acceso: noviembre de 2015).

Ploper, L.D.; González, V.; Pérez, B.A.; Pioli, R.; Rodríguez Pardina, P; Sandiani, M.; Distéfano, S.; Sillón, M. 2008. Enfermedades de *Glycine max* (L.) Merrill (soja, soya, poroto soja, frijol soja). En: Nome S.F.; Docampo D.M.; Conci, L.R.; Laguna, I.G. Eds. Atlas Fitopatológico Argentino, Vol 1, N° 2. Septiembre 2008, Córdoba, Argentina.
<http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=635>. (último acceso: noviembre de 2015).

Reséndiz Arvizu, V.H. 2009. Uso de *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador de algunos agentes causales de la pudrición de raíz en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en el estado de Durango. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamp. México. <http://tesis.ipn.mx/xmlui/handle/123456789/8454> (último acceso: noviembre de 2015).

Sistema Integrado de Información Agropecuaria (SIIA). Ministerio de Agroindustria de la Nación.

http://www.sii.gov.ar/_apps/sii/estimaciones/estima2.php (último acceso marzo de 2016).

United States Department of Agriculture (USDA) <http://www.usda.gov> (último acceso: marzo de 2016).