



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Papel de hongos endófitos septados
oscuros en la tolerancia del pasto
Brachiaria decumbens Stapf a condiciones
ambientales extremas de sequía y baja
fertilidad general del suelo**

Diana Maritza Tamayo Londoño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2017

**Papel de hongos endófitos septados
oscuros en la tolerancia del pasto
Brachiaria decumbens Stapf a condiciones
ambientales extremas de sequía y baja
fertilidad general del suelo**

Diana Maritza Tamayo Londoño

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

Juan Carlos Pérez N. Ph.D

Línea de Investigación:

Biodiversidad y ecología de microorganismos del suelo

Grupo de Investigación:

Sistemas Simbióticos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2017

Agradecimientos

Al profesor Juan Carlos Pérez, director de la tesis, por su orientación y compromiso en este proceso.

También a la química Gloria Arango, a los compañeros del Grupo de investigación sistemas simbióticos especialmente a Ana María Gutiérrez y Elizabeth Meneses Ospina y al profesor Guillermo Correa por su apoyo y aportes recibidos.

A la Facultad de Ciencias y Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín (DIME), a través de la convocatoria del programa nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015, por el apoyo parcial para realización de esta tesis.

A mi madre, familiares y amigos por su paciencia, apoyo y motivación, mil gracias

Resumen

La adaptación de plantas a condiciones ambientales extremas puede depender de la asociación con hongos endófitos de raíces. Aunque los hongos endófitos septados oscuros (HESO) se encuentran comúnmente en raíces de pastos tropicales, se desconoce su papel en la tolerancia de las plantas a condiciones de sequía o baja fertilidad general del suelo. Este estudio consistió en tres experimentos principales. Inicialmente se aislaron de raíces sanas de *Brachiaria decumbens* y se diferenciaron por su actividad in vitro o en plántulas un conjunto de colonias de hongos endófitos septados. Luego se adaptó y evaluó un sistema de germinación masivo de semillas (SGMS), que permitió evaluar métodos físico-químicos para desinfección de semillas de *B. decumbens* en estudios con hongos endófitos de raíces. En el segundo y tercer experimento en invernadero, plántulas de *B. decumbens* obtenidas de semillas con o sin reducción de HESO, por desinfección o no con calor, se sometieron a condiciones extremas de sequía (sequía y no sequía) o baja fertilidad del suelo (fertilidad alta y baja). En el primer experimento, ninguno de los métodos de desinfección eliminó totalmente los endófitos de la raíz, pero sí redujo el porcentaje de colonización en raíces. En el segundo y tercer experimento la exposición de las plántulas a la sequía y baja fertilidad del suelo tuvo efecto negativo en la simbiosis. Los efectos de estos hongos en la tolerancia del pasto a las condiciones de sequía y baja fertilidad del suelo se observaron principalmente en variables medidas en las hojas. En general, estos resultados sugieren que tanto la planta como sus simbioses pueden ser afectados diferencialmente por condiciones ambientales.

Palabras claves: Actividad enzimática, *Brachiaria decumbens*, desinfección, endófitos septados oscuros, fertilidad, sequía, simbiosis.

Abstract

Plant adaptation to extreme environmental conditions may depend on the association with endophytic fungi in roots. Although there are few studies upon the role of dark septate endophytes (DSE) in symbiosis with tropical grasses, their role is not completely clear, specially under drought conditions or low soil fertility. This study consisted in three main experiments. Initially, a dark septate fungi colony collection was obtained from healthy roots of *Brachiaria decumbens* plants, which was further screened based on in vitro biochemical activity or root colonization. Then a system of massive germination of seeds (SGMS) was adapted and evaluated. After that, it allowed to test physico-chemical methods for disinfecting *B. decumbens* seeds in studies with root fungal endophytes transmitted vertically by seeds. In the second and third experiment in a greenhouse, *B. decumbens* seedlings roots from seeds naturally infected by DSE fungi, either with heat treatment for reducing these fungi or without this treatment, were exposed to extreme conditions of drought or low soil fertility. Two levels of each condition were tested (drought and non-drought; high and low fertility). In the first experiment it was found that none of the disinfection methods eliminated completely the root endophytes, but they reduced the colonization percentage. In the second and third experiment, the seedlings were negatively affected by drought and low soil fertility. Some variables measured in leaves showed positive effects of these fungi on grass tolerance to drought and low soil fertility. In general, these results suggest that plants and their symbionts are both differentially affected by environmental conditions.

Keywords: *Brachiaria decumbens*, dark septate endophytes, disinfection, drought, enzymatic activity, fertility, symbiosis.

Contenido

Resumen	V
Abstract.....	VI
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas	XI
Introducción	1
1. Efecto de los hongos septados oscuros inoculados en raíces de <i>Brachiaria decumbens</i> en su tolerancia a condiciones de sequía.	4
1.1 Resumen	4
1.2 Abstract	5
1.3 Introducción	5
1.4 Materiales y métodos	8
1.5 Resultados.....	14
1.6 Discusión	22
1.7 Conclusiones	25
2. Evaluación rápida de métodos de eliminación de hongos endófitos en raíces de <i>Brachiaria decumbens</i>.	26
2.1 Resumen	26
2.2 Abstract	27
2.3 Introducción	27
2.4 Materiales y Métodos	28
2.5 Resultados.....	31
2.6 Discusión	35
2.7 Conclusión	37
3. Efecto de hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia de <i>Brachiaria decumbens</i> a baja fertilidad del suelo o sequía	39

3.1 Resumen.....	39
3.2 Abstract	40
3.3 Introducción.....	40
3.4 Materiales y métodos.....	42
3.5 Resultados	45
3.6 Discusión.....	54
3.7 Conclusiones	57
Bibliografía	58
Anexos.....	67

Lista de figuras

Figura 1-1. Aislamiento de hongos endófitos septados oscuros.....	9
Figura 1-2. Niveles de síntomas de estrés en hojas	12
Figura 1-3. Colonias de hongos septados oscuros escogidas para prueba de recolonización en raíces de <i>B. decumbens</i>	14
Figura 1-4. Morfología radicular de plántulas de <i>B. decumbens</i>	16
Figura 1-5. Sistema de inoculación artificial de hongos septados oscuros en raíces de <i>B. decumbens</i>	17
Figura 1-6. Evaluación de hongos septados oscuros aislados de raíces de <i>B. decumbens</i>	18
Figura 1-7. Colonias de hongos endófitos septados oscuros en medio PDA aisladas de raíces de <i>B. decumbens</i>	19
Figura 1-8. Colonización de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en la raíz de <i>B. decumbens</i> y sometimiento de plántulas a sequía.....	19
Figura 1-9. Efecto de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en el contenido relativo de agua en hojas de plántulas de <i>B. decumbens</i> sometidas a sequía.....	20
Figura 1-10. Efecto de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en la morfología de la raíz primaria plántulas de <i>B. decumbens</i> sometidas a sequía.....	21
Figura 2-1. Sistema de germinación masiva de semillas de <i>B. decumbens</i>	29
Figura 2-2. Germinación de semillas y longitud de raíces después de los tratamientos con temperatura alterna y continúa.	31
Figura 2-3. Actividad microbial residual 24 y 72 horas después de aplicar métodos de desinfección externa en semillas de <i>B. decumbens</i>	32
Figura 2-4. Germinación de semillas, longitud y colonización de endófitos en raíces en cada tratamiento.....	33

- Figura 2-5.** Presencia de esporas de hongos endófitos al interior de las raíces de *B. decumbens* cinco días después de aplicados los tratamientos de desinfección externa e interna a las semillas.34
- Figura 2-6.** Desinfección de semillas de *B. decumbens* por calor en diferentes tiempos de exposición34
- Figura 2-7.** Diferentes estructuras formadas por hongos endófitos en la raíz de *B. decumbens*.....35
- Figura 3-1.** Valores relativos de los componentes químicos de dos tipos de suelo con fertilidad variable.....43
- Figura 3-2:** Estructuras formadas por hongos endófitos septados oscuros en la raíz de *B. decumbens*.....46
- Figura 3-3:** Formación de diferentes estructuras de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de plántulas de *B. decumbens* sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. Residuales de variables con distribución normal.....50
- Figura 3-4:** Formación de diferentes estructuras de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de plántulas de *B. decumbens* sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. Residuales de variables que no cumplen supuestos de normalidad.....50
- Figura 3-5.** Biomasa de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. Residuales de variables con distribución normal.....51
- Figura 3-6.** Biomasa de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía y fertilidad variable. Residuales de variables que no cumplen supuestos de normalidad.....51
- Figura 3-7.** Altura de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de fertilidad variable.....52
- Figura 3-8.** Contenido relativo de agua en hojas de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía.....52
- Figura 3-9.** Número y diámetro de raíces adventicias de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable.....53

Lista de tablas

Tabla 1-1. Número de colonias de hongos aislados de raíces de <i>B. decumbens</i> usando diferentes medios de cultivo.....	15
Tabla 1-2: Recolonización de hongos septados oscuros y su efecto en la sanidad de las plántulas y en la morfología de las raíces de <i>B. decumbens</i>	16
Tabla 1-3. Evaluación actividad enzimática y velocidad de crecimiento de hongos septados oscuros.....	18
Tabla 1-4: Producción de especies reactivas de oxígeno en hojas de plántulas de <i>B. decumbens</i> sometidas a sequía e inoculadas con los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43. Detección por exposición a Paraquat y foto-blanqueamiento.....	20
Tabla 1-5: Síntomas de estrés en plántulas de <i>B. decumbens</i> sometidas a sequía e inoculadas con los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43.....	21
Tabla 2-1. Métodos de desinfección externa e interna de semillas de <i>B. decumbens</i>	30
Tabla 3-1: Resultados estadísticos del ANAVA, examinando efectos principales de condiciones de sequía o fertilidad variable sobre plántulas de <i>B. decumbens</i> infectadas con hongos endófitos septados oscuros.....	49
Tabla 3-2: Síntomas de deficiencia nutricional en hojas de plántulas de <i>B. decumbens</i> con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de fertilidad variable.....	54

Introducción

En un estudio realizado por la Encuesta Nacional Agropecuaria para el 2013, se encontró que Colombia destina el 80,3% de la distribución de la superficie en uso del suelo a la actividad pecuaria y el 68% de estas hectáreas corresponden a pastos naturales y mejorados, siendo Antioquia, Meta y Casanare los principales departamentos con mayor extensión de pastos.

Los cambios climáticos de los últimos años a nivel mundial, han generado condiciones ambientales extremas, como el fenómeno del Niño y la Niña en Colombia, sumado a esto se estima un aumento en la temperatura media de entre 2 y 4°C al 2070 y disminución de hasta el 30% en la precipitación en algunas regiones Colombianas (PNUD, 2010). Además el 80% de los suelos Colombianos son ácidos (Zapata, 2002), en las sabanas tropicales de los llanos orientales predominan los suelos Oxisoles y Ultisoles (Amézquita et al., 2013), que son ácidos y se caracterizan por la deficiencia de N, P, Ca y Mg y alta toxicidad, esta última debido al aumento de la concentración del Fe, Al y /o Mn. Bajo esas condiciones de fertilidad comúnmente se limita la producción agrícola (Rao et al., 1998).

Los factores anteriores disminuyen severamente la producción y calidad del pasto afectando su calidad nutricional con consecuencias negativas en el peso vivo del ganado y la producción de leche (Bernal & Espinosa, 2003; Cuadrado et al., 2003). Se han desarrollado diferentes estrategias para evitar la escases de pastos, pero muchas de estas prácticas pueden llegar a ser costosas, como el uso de riego, henificación y ensilaje (Faria, 2006), tratamiento de suelos ácidos utilizando fertilizantes y encalamiento (Sánchez & Salinas, 1983), combinación de gramíneas - leguminosas y finalmente como mejor estrategia, el uso de variedades que se adapten a la sequía y a suelos con baja fertilidad. (Sánchez & Salinas, 1983; Rincón, 1999; Altieri, 2008).

Brachiaria decumbens es una de las especies de pastos más cultivadas en Colombia en sitios de producción de ganadería en el trópico bajo (Rincón, 1999). Por ser tolerante a la sequía (Rao et al., 1998), crece bien en condiciones de acidez y toxicidad de Fe y Al, y puede extraer nutrientes como P en suelos con mínima disponibilidad (Bernal & Espinosa 2003).

Las plantas en los ecosistemas naturales forman simbiosis con hongos micorrízicos y/o con otros hongos endófitos (Rodríguez et al., 2004). Dentro de los hongos endófitos se encuentran los Hongos Endófitos Septados Oscuros (HESO) que son un grupo misceláneo del filo Ascomycota, descritos así por poseer hifas melanizadas septadas que colonizan tejidos internos de la raíz sin causar aparente efecto negativo sobre la planta huésped (Jumpponen & Trappe, 1998). Están presentes en ambientes extremos, como en áreas de alta temperatura y suelos secos (Porras et al., 2008; Knapp et al., 2012), en zonas de baja temperatura (Newsham et al., 2009). También pueden facilitar la toma de nutrientes en la planta en algunos ambientes naturales o bajo condiciones experimentales controladas (Jumpponen et al., 1998; Jumpponen,

2001). Se han encontrado estos hongos en forma abundante en raíces de pasto Kikuyo en zonas aledañas a la ciudad de Medellín (Gallego, 2012). En una recopilación de diferentes revisiones Jumpponen & Trappe, (1998) registran que este grupo de hongos se han asociado a aproximadamente 600 especies de plantas en todo el mundo, inclusive en plantas no micorrizales. Mandyam & Jumpponen, (2005), además, a partir de diferentes revisiones, reportaron que las capacidades enzimáticas de los HESO incluyen celulasas, amilasas, enzimas proteolíticas, lacasas, pectinasas entre otras, por lo que podría sugerir el potencial para acceder a detritos de C, N y P. Así que la simbiosis de las plantas con este grupo de hongos le facilitarían a la planta la toma de nutrientes y agua del suelo, teniendo efecto en el aumento de la biomasa foliar y/o radicular o en la longitud de la raíz (Jumpponen et al., 1998; Newsham, 1999; Mahmoud & Narisawa, 2013).

Para conocer al menos preliminarmente la diversidad y efecto de los HESO en el pasto *B. decumbens* es necesario aislarlos a través de diferentes medios de cultivo donde se puedan obtener la mayor cantidad de aislados con características morfológicas típicas de este grupo de hongos. Tradicionalmente los medios de cultivo incluyen diversas fuentes de carbono como la maltosa, glucosa y sucrosa, que son usados en los medios de cultivo comerciales para hongos. Sin embargo, sería preferible acercarse más a las condiciones nutricionales a las que ya están adaptados los endófitos, como las que podrían encontrarse en extractos de raíz.

Para estudios con estos hongos basados en inoculación de suelo o material vegetal, la mayor dificultad es que los HESO ya están presentes en las semillas. Son considerados sistémicos y habitantes de espacios apoplásticos de la raíz, donde forman estructuras inter e intracelularmente. Están cohesivamente ligados a la membrana plasmática externa de la célula de la planta por lo que son transmitidos verticalmente a través de las semillas. (Barrow 2003; Barrow et al, 2004). Es difícil entonces planear experimentos bien controlados, con plantas libres de hongos, así que para su estudio es necesario evaluar diversas técnicas de desinfección superficial de las semillas e interna en raíces. Para este fin se han utilizado para las semillas componentes físicos como el calor (Misaghi & Donndelinger, 1990; Kannadan & Rudgers, 2008) o químicos como etanol (C_2H_6O) (Ernst et al., 2003), hipoclorito de sodio ($NaOCl$) (Simons et al., 1996), hipoclorito de calcio ($Ca(ClO)_2$) (Knudson, 1929), ácido sulfúrico (H_2S_4) (Hepper, 1981) y para la raíz se han usado fungicidas de acción sistémica, de contacto o traslaminar (Latch & Christensen, 1982; Gibert & Hazard, 2011; Barney, 2003; Ernst et al., 2003). Igualmente se debe encontrar un método que nos permita verificar si el material vegetal empleado estaba realmente limpio al momento de tomar variables de interés, y a la vez obtener resultados rápidamente.

El hecho de que estos hongos se encuentren asociados a plantas en sitios extremos sugiere que cumplen una función importante en la tolerancia o resistencia de la planta a las condiciones extremas del ambiente, como ocurriría en suelos secos o bajos en nutrientes. Sin embargo este grupo de hongos ha sido muy poco estudiado especialmente en la tolerancia de plantas a condiciones extremas de sequía. Aunque son bien conocidos los efectos de otros hongos endófitos como los formadores de micorrizas, que son simbioses obligados, ese grupo de hongos septados oscuros presenta relaciones evolutivas y simbióticas diferentes y pueden ser aislados en medios artificiales de cultivo.

De acuerdo a lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: el conocimiento de las condiciones simbióticas actuales y posible papel de hongos endófitos septados oscuros en raíces del pasto *B. decumbens* en dos suelos con fertilidad diferente; la evaluación de tratamientos físico- químicos para la eliminación o reducción de hongos

endófitos presentes en semillas de *B. decumbens*, y por último la determinación del papel de la simbiosis con hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto *B. decumbens* a las condiciones ambientales extremas de sequía y baja fertilidad general en el suelo.

1. Efecto de los hongos septados oscuros inoculados en raíces de *Brachiaria decumbens* en su tolerancia a condiciones de sequía.

1.1 Resumen

Los hongos endófitos septados oscuros (HESO) colonizan de forma abundante raíces, pero aún no queda clara la función de ellos en la tolerancia de los pastos a condiciones de estrés. Para evaluaciones preliminares se aislaron hongos de raíces de *Brachiaria decumbens* utilizando varios azúcares como fuentes de carbono. Los aislamientos prometedores se seleccionaron con base en una prueba de recolonización de raíces, seguida por una prueba de velocidad de crecimiento de colonias in vitro y pruebas de producción enzimática. Por último se evaluó en laboratorio el efecto de los hongos en la tolerancia de plántulas de *B. decumbens* a la condición de sequía. Los medios extracto de malta y extracto de raíz fueron donde mayor número de aislados de HESO se obtuvieron. Ocho de los nueve aislados mostraron habilidades de colonización en la raíz. Se detectó una tendencia general en el aumento del crecimiento de la plúmula más que de la raíz y la inoculación del aislado 38 resultó en mayor proporción de raíces laterales. El hongo 38 estuvo entre los aislados con menor velocidad de crecimiento. El hongo 43 presentó mayor producción de enzimas proteolíticas y el hongo 24 pigmentó con mayor intensidad el medio PDA. Las plántulas no inoculadas e inoculadas con los hongos 24, 38 y 43 expuestas o no a sequía mostraron una gran variabilidad en el crecimiento y colonización de la raíz, especies reactivas de oxígeno y contenido relativo de agua en hojas. Se registró en general una gran variabilidad, que pudo deberse a la presencia de HESO en plántulas antes de iniciar el experimento, lo que limitaría los alcances del estudio. Esos resultados impulsaron el desarrollo de un nuevo experimento orientado a la obtención de material vegetal limpio para uso en este tipo de estudios.

Palabras claves: Actividad enzimática, *Brachiaria decumbens*, endófitos septados oscuros, sequía, simbiosis.

1.2 Abstract

Dark septate endophytic fungi are ubiquitous root colonizers, but it is still unclear their role on the tolerance of tropical grasses to stressful environmental conditions. In this study several fungi were isolated from roots of *B. decumbens* using different sugars as carbon sources. Promising isolates were selected with basis on a resynthesis test followed by an in vitro growth velocity and enzyme production tests. Finally the effect of these fungi in the tolerance of *B. decumbens* seedlings to drought conditions was evaluated in the laboratory. The highest number of DSE isolates was obtained in malt extract and root extract culture media. Nine out of ten fungi isolates tested showed ability to colonize roots. A general trend to increase the shoot to root ratio was detected as a consequence of DSE inoculation, and at least one of them, isolate 38th, presented a greater proportion of lateral roots. This isolate also showed the slowest growth speed. Isolate 43 was the best producer of proteolytic enzymes, whereas isolate 24 was the most intense producer of a dark pigment on PDA medium. Under drought and non-drought conditions, all plants from inoculated, as well as non inoculated treatments showed a high variability in root growth, colonization by DSE, reactive oxygen species and relative water content in leaves. This might be due to the presence of seed borne DSE in plants before the beginning of the experiment. Which would limit the scope of this study. These results promoted the development of a new study focussing in how to obtain clean plant material to be used in further experiments.

Keywords: *Brachiaria decumbens*, dark septate endophytes, drought, enzymatic activity, symbiosis.

1.3 Introducción

Los hongos endófitos septados oscuros (HESO) generalmente pertenecen al filo Ascomycota, pueden ser conidios o estériles que forman estructuras como hifas y microesclerios melanizados inter e intracelularmente en la raíz sin causar aparente efecto negativo sobre la planta huésped (Rodríguez et al., 2009). En una recopilación de diferentes revisiones Jumpponen & Trappe, (1998) encontraron que este grupo de hongos se han asociado a aproximadamente 600 especies de plantas en todo el mundo inclusive en plantas no micorrizales. Están presentes en diferentes tipos de ambientes extremos como alpinos (Schadt, 2001), regiones polares (Newsham, 2009), semiáridos (Porrás, 2008; Knapp, 2012). También se han encontrado estos hongos en forma abundante en raíces de pastos como Kikuyo que crece en zonas aledañas a la ciudad de Medellín. (Gallego, 2012).

Colombia es un país tropical que destina el 80,3% de la distribución de la superficie en uso del suelo a la actividad pecuaria y el 68% de estas hectáreas corresponden a pastos naturales y mejorados (DANE, 2013). *Brachiaria decumbens* es una planta herbácea perenne tropical, de porte erecto, procumbente o decumbente, (Roche et al., 1990) una de las especies comerciales de *Brachiaria* más cultivadas en América tropical (central y sur) (Valério et al., 1998) y uno de los pastos más cultivados en

Colombia en el trópico bajo en sitios de producción ganadera (Rincón, 1999) ya que se adaptan a la sequía (Rao et al., 1998). Las especies de *Brachiaria* crecen bien en condiciones de acidez y toxicidad por Fe y Al, y pueden extraer nutrientes como P en suelos de mínima disponibilidad (Bernal & Espinosa, 2003). También este pasto es productivo bajo uso intensivo y pisoteo animal, con buena calidad nutricional, es bien consumido por el ganado bovino y es susceptible a la plaga del salivazo. (Keller-Grein et al., 1998).

Los cambios climáticos de los últimos años a nivel mundial han generado condiciones ambientales extremas como el fenómeno del Niño y la Niña en Colombia, sumado a esto se estima un aumento en la temperatura media de entre 2 y 4°C al 2070 y disminución de hasta el 30% en la precipitación en algunas regiones Colombianas (PNUD, 2010). Estos factores disminuyen severamente la producción de pastos afectando su calidad nutricional con consecuencias negativas en el peso vivo del ganado y la producción de leche (Bernal & Espinosa, 2003; Cuadrado et al., 2003). Se han desarrollado diferentes estrategias para evitar la escases de pastos, muchas de estas prácticas pueden llegar a ser costosas como el uso de riego, henificación y ensilaje (Faria, 2006), tratamiento de suelos ácidos utilizando fertilizantes y enclavamiento (Sánchez & Salinas, 1983), combinación de gramínea - leguminosa y como mejor estrategia el uso de variedades que se adapten a la sequía y a suelos con baja fertilidad. (Sánchez & Salinas, 1983; Rincón, 1999; Altieri, 2008).

Varios estudios se han realizado con *B. decumbens* evaluando las diferentes respuestas de adaptación a la sequía sin tener en cuenta la simbiosis con hongos (Guenni et al., 2002; Guenni et al., 2004), entre los mecanismos utilizados por la planta se encuentran el enrollamiento de las hojas para conservar la humedad (Guenni et al., 2004), cierre estomático temprano por la rápida reducción del contenido relativo de agua (CRA) en hojas. Este pasto también tiende a formar una alta densidad radical que extrae humedad de los horizontes superficiales al inicio de la sequía, sin embargo es posible que esta pérdida temprana del agua superficial estimule un enraizamiento más profundo, para seguir accediendo a la humedad del suelo. Para limitar la pérdida de agua por transpiración la planta también disminuye la producción de biomasa aérea (Guenni et al., 2006).

Por otra parte, las enzimas extracelulares producidas por hongos son de gran ayuda para que las plantas puedan obtener del suelo nutrientes provenientes de compuestos más complejos. Mandyam & Jumpponen, (2005) a partir de diferentes revisiones reportaron las capacidades enzimáticas de los HESO, encontrándose celulasas, amilasas, enzimas proteolíticas, lacasas, pectinasas entre otras, por lo que podría sugerir el potencial para acceder a detritos de C, N y P. Así que la simbiosis de las plantas con este grupo de hongos le facilitaría a la planta la toma de al menos algunos nutrientes y agua del suelo, teniendo efecto en el aumento de la biomasa foliar y/o radicular o en la longitud de la raíz (Jumpponen et al., 1998; Newsham, 1999; Mahmoud & Narisawa, 2013),

Los HESO por su gran abundancia, el gran rango de hospederos que coloniza y por encontrarse en plantas en sitios extremos, se piensa que cumplen una función importante en el ecosistema como favorecer la tolerancia o resistencia de la planta a las condiciones extremas del ambiente, como ocurriría en suelos secos. Sin embargo este grupo de hongos ha sido muy poco estudiado especialmente su papel en la tolerancia de plantas tropicales a condiciones extremas de sequía.

Se ha encontrado que los hongos endófitos del grupo Clavicipitaceus mejoran la tolerancia de pastos a condiciones de sequía en el suelo, aunque ello podría

dependen de las condiciones ambientales en las que se encuentra la simbiosis. *Poa alsodes* infectada con *Neotyphodium* y en baja disponibilidad de agua, aumentó la biomasa mayormente en la raíz que en la parte aérea y provocó menor senescencia en hojas con respecto a plantas desinfectadas (Kannadan & Rudgers, 2008). Morse, (2002) y colaboradores observaron en plantas de *Festuca arizona* infectadas también con *Neotyphodium* y con disponibilidad de agua, que el endófito actuó como antagonista disminuyendo la biomasa. Estos hongos se ven afectados igual que la planta cuando son expuestos a sequía (Rudgers & Swafford, 2009), puede ser debido al costo de la planta para sostener la infección endófito (Cheplick, 2004) o el costo metabólico por la lucha entre planta y hongo para suplir la deficiencia o la escasez de nutrientes (Cheplick et al, 1989).

El hongo endófito Basidiomycete *Piriformospora indica* le confiere tolerancia a estrés por sequía a diferentes especies de plantas como la Col china (Sun et al., 2010), *Arabidopsis* (Sherameti et al., 2008) y la fresa (Husaini et al., 2012). Este hongo estimula tempranamente la morfología de los pelos radiculares y aumenta la biomasa aérea en *Arabidopsis thaliana* (Peškan - Berghöfer et al., 2004), también en plantas transgénicas de la fresa incrementa el contenido relativo de agua en hojas, la clorofila y la biomasa aérea, al igual que la fácil recuperación de las plantas cuando son rehidratadas nuevamente (Husaini et al., 2012), en la col china previenen las especies reactivas de oxígeno (ERO) por el retardo de la degradación de lípidos polinsaturados y aumentan de la actividad de enzimas antioxidantes (Sun et al., 2010). Los hongos de clase 2 del grupo "no clavicipitaceous" como *Fusarium*, *Curvularia* y *Colletotrichum magna* también confieren tolerancia a sequía en plantas de *Solanum lycopersicum*, *Leymus mollis*, *Dichanthelium lanuginosum* y *Oryza sativa* independiente del hábitat de origen (Rodríguez et al., 2008; Redman et al., 2011).

Para conocer la diversidad y efecto de los HESO en el pasto *B. decumbens* es necesario aislarlos a través de diferentes medios de cultivo donde se puedan obtener la mayor cantidad de aislados con características morfológicas típicas de este grupo de hongos, y abarcar diversas fuentes de carbono como la maltosa, glucosa y sucrosa, que son comunes en los medios de cultivo comerciales para hongos, pero también es preferible simular al menos en parte las condiciones nutricionales a las que ya están adaptadas los endófitos, como las que podrían encontrarse en extractos de raíz.

El objetivo para este estudio es evaluar el efecto de aislados de hongos septados oscuros en la tolerancia de *B. decumbens* a la sequía. Para llegar a esto se obtuvo una colección de hongos a través de cuatro medios de cultivo, dos tradicionales PDA (Dextrosa) y EM (maltosa), un medio modificado MMN (sacarosa y maltosa) y un medio preparado a partir de extracto de raíz (variedad de azúcares) que simula un poco más su hábitat natural. Por último se seleccionaron los HESO para este experimento con base en diferencias en sus capacidades enzimáticas y velocidad de crecimiento.

1.4 Materiales y métodos

Aislamiento de Hongos Endófitos Septados Oscuros (HESO)

Las raíces del pasto *B. decumbens* fueron obtenidas de plantas creciendo libremente en el campus de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, ubicado en la zona climática perteneciente al bosque húmedo premontano (bh-PM), a una altura de 1.550 m.s.n.m., 21,8°C como promedio de temperatura anual, precipitación promedio de 1670 mm y una humedad relativa del 69%, en un suelo del orden inceptisol (Ramírez et al, 2006). Se tomaron plantas con aspecto saludable, las raíces fueron transportadas con el suelo en bandejas de plástico al Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y las muestras fueron procesadas el mismo día de la recolección.

Raíces sanas del pasto *B. decumbens* se cortaron en piezas de 3 a 5 cm de longitud, se lavaron 10 veces con agua de grifo, eliminando la mayor cantidad posible de suelo adherido. En cámara de flujo laminar, los fragmentos fueron esterilizados superficialmente, sumergiéndolos en etanol al 95% (60 s), agua estéril (10 s), hipoclorito al 2,5% (120 s) y agua estéril (120 s). Los fragmentos se cortaron en piezas de 3 a 5 mm de largo, y se transfirieron con pinzas estériles a placas de petri (dividida en 4 cuadrantes) a las que se les adicionaron gotas de agar (Silvani et al., 2008) de Papa dextrosa (PDA) al 2 %, Extracto de Malta (EM), Modificado Melin-Norkrans (MMN) y Extracto de raíz (ER), suplementado con los antibióticos Ampicilina y Tetraciclina (100 mg/L). Posteriormente se incubaron en la oscuridad a 25°C. (Figura 1-1, A)

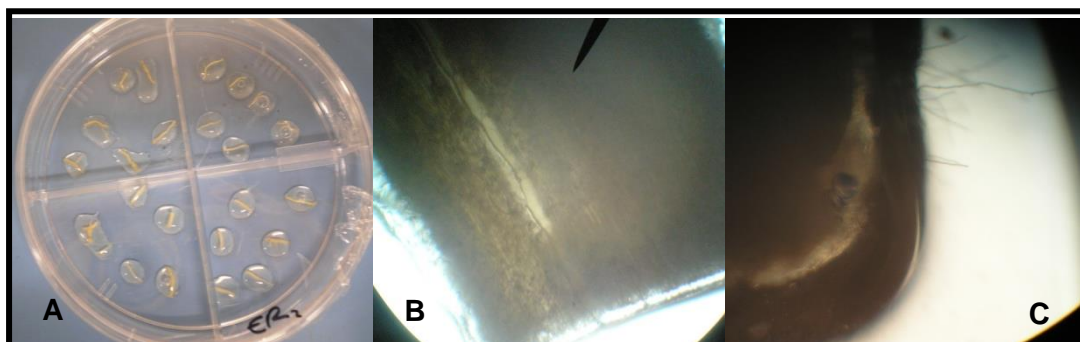
Se tomaron de los extremos de la raíz las hifas emergentes (Figura 1-1, B y C) y se transfirieron al mismo medio de cultivo del que fueron aisladas, se incubaron a 25°C en la oscuridad por 4 a 15 días. Usando un microscopio OlympusBmax (magnificado 40X) se observaron los diferentes hongos aislados, identificando algunas estructuras características, como hifas melanizadas septadas, clamidosporas y microesclerocios. Se fotografiaron con cámara digital Celestron modelo 44421 (aumento 15X).

El almacenamiento se realizó cortando pedazos de 8 a 10 mm del borde de la colonia de los hongos, se introdujeron en viales estériles de 2 mL y se almacenaron a 4°C.

Debido a que muchas de las colonias de los hongos endófitos septados oscuros tuvieron muy poco crecimiento en los medios de cultivo, se incrementaron utilizando 190 g de arena con 10 g de sorgo triturado y 30 mL de agua destilada. Esta mezcla se distribuyó en bolsas de polipropileno de 5 x 9,5 cm y se autoclavó dos veces por una hora, a 121°C. Cuando se enfrió, se agregaron tres pedazos de medio de 8 mm de diámetro colonizados por el inóculo y se incubaron por cuatro semanas a 25°C. (Newsham, 1999)

De la colección de hongos septados oscuros (HSO) obtenida se escogieron nueve hongos para el experimento de recolonización, se tomaron por lo menos dos hongos aislados de cada medio de cultivo y que presentaron mayor incremento en la mezcla de sorgo y arena.

Figura 1-1. Aislamiento de hongos endófitos septados oscuros, A. siembra de raíces en gotas de los diferentes medios, B y C hifas emergentes del interior de la raíz.



Recolonización por hongos endófitos aislados en raíces de *B. decumbens*

Se utilizaron semillas comerciales de *B. decumbens* (Agrosemillas, lote: R044/12, pureza 95,1%), que fueron esterilizadas previamente con alcohol al 70% por 30 min, (Passos et al., 2009), seguido de 1% de hipoclorito de sodio durante 30 min (Yamamoto et al., 1999; Barbosa et al., 2008) y se enjuagaron con agua destilada. Estas semillas se colocaron en placas de Petri (diámetro = 9 cm) con papel filtro humedecido y se incubaron en la oscuridad a 25°C por tres días. Para la inoculación de hongos, cuando las raíces de las plántulas alcanzaron 1 cm de longitud se les hizo una leve herida superficial con un papel de lija número 600, previamente sumergida en una suspensión de hifas, preparada al agregar dos pedazos de medio de 8 mm de diámetro colonizados por el inóculo en viales con 2 mL de agua destilada estéril, se agitaron en vortex hasta que se desprendiera del medio el micelio del hongo. Las plántulas se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido y se incubaron a temperatura ambiente por 12 días con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se dispusieron 10 réplicas para cada aislado fúngico evaluado (9 hongos) y 10 plántulas control a las que se le rasparon las raíces con papel lija estéril que fue sumergida en agua destilada. Las plántulas se cosecharon a los 12 días después de la inoculación. Se consideró un hongo endófito septado oscuro si colonizaba la raíz sin ningún efecto negativo visible para la planta y por la presencia de estructuras características de este grupo de hongos en las raíces. Se tomaron fotos de las plántulas y se midió la longitud de la plúmula y la raíz con el programa de procesamiento de imágenes digital ImageJ (Rasband, 2007).

Para determinar si los hongos colonizaron o no las raíces se cortaron fragmentos de raíz de aproximadamente 1 cm para cada tratamiento, fueron clarificadas y teñidas utilizando tinta en vinagre según el procedimiento descrito por Vierheilig et al., (1998). Se montaron las raíces sobre portaobjetos con cuadrícula, y usando microscopio OlympusBmax (magnificado 40X) se observó si había presencia o no de estructuras características de cada hongo inoculado. Se tomaron fotos con la cámara digital Celestron modelo 44421 (aumento 15X).

Con los hongos que colonizaron la raíz, que presentaron menos plántulas muertas y mayor efecto positivo en la plántula estimado como número de raíces producidas se hicieron pruebas enzimáticas y se determinó su velocidad de crecimiento de colonia

en medio de cultivo, para asegurar así que estos aislamientos eran diferentes no solo morfológicamente sino también fisiológicamente.

Evaluación actividad enzimática y velocidad de crecimiento de HESO

- Velocidad de crecimiento: Cada uno de los nueve hongos que fueron almacenados se reactivaron en medio PDA al 2% y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 15 días. De cada hongo se tomó un pedazo de 5 mm de diámetro del borde de la colonia y se transfirió a medio PDA al 2%, se incubó por 12 días, cada tres días se midió el diámetro de la colonia. Luego los datos de diámetro se ajustaron mediante una ecuación de regresión lineal, se tomó la pendiente que corresponde a la velocidad media de crecimiento (cm / día) para cada tipo de hongo (Vázquez et al., 2002).
- Actividad enzimática: Se tomó un pedazo de 5 mm de diámetro de cada uno de los nueve hongos reactivados en medio PDA al 2% y se transfirió a cada uno de los medios para evaluar la actividad enzimática.
- ✓ Amilasas: Se utilizó un medio con almidón compuesto por 2 gr de almidón, 1 gr de peptona, 1 gr de extracto de levadura, 20 gr de agar y 1 L de agua destilada. Después de 12 días las placas de petri con el medio se inundaron con una solución acuosa de IKI al 1% (Lugol), la prueba era positiva si alrededor de la colonia se formaba un halo de color amarillo claro, en vez de un medio azul. (Gessner, 1980 citado por Abdel-Raheem & Shearer, 2002).
- ✓ Actividad celulolítica: El medio estaba compuesto por 10 gr de carboximetilcelulosa (CMC), 5 gr de Sulfato de Amonio, 1 gr de K_2HPO_4 , 0,01gr de $CaCl_2 - 2H_2O$, 0,5 gr $MgSO_4 - 7 H_2O$, 0,5 gr de extracto de levadura, 15 de agar y 1 L de agua destilada. Luego de 12 días las placas de petri se inundaron con rojo congo al 2% se dejó por 15 min, se lavaron con agua destilada la superficie del agar, luego se inundaron con NaCl 1 M por 15 minutos y se retiró la solución. La degradación de CMC alrededor de la colonia apareció como una zona de color amarillo-anaranjado opaco contra un color rojo para no degradación de CMC. (Pointing, 1999)
- ✓ Actividad proteolítica: El medio estaba compuesto por agar nutritivo y gelatina al 0,4% (la solución de gelatina de 8% se esterilizó aparte del agar nutritivo luego se agregó a este en una proporción de 5mL/100mL de medio agar nutritivo). Después de 12 días las placas de petri se inundaron con una solución saturada de sulfato de amonio por 15 min y este precipitó la proteína. Fue considerada positiva la prueba (presencia de proteasas) si aparecía una zona clara alrededor de la colonia. (Society of American Bacteriologists, 1951; Hankin & Anagnostakis, 1975)

Se midió para todas las pruebas el diámetro de la colonia (cm) cada tres días por los 12 días de incubación y el diámetro del halo (cm).

A partir de esta prueba se escogieron los tres hongos que serían utilizados en el experimento de estrés por sequía.

Efecto de aislados de hongos en plántulas de *B. decumbens* bajo condiciones de sequía.

Cada uno de los tres hongos almacenados se reactivó en medio PDA al 2% y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 15 días.

Germinación de semillas de *B. decumbens*: Se utilizaron semillas comerciales de *B. decumbens* (Agrosemillas, lote: R044/12, pureza 95,1%) que fueron esterilizadas previamente con alcohol al 70% por 30 min, (Passos et al., 2009), seguido de 1% de hipoclorito de sodio durante 30 min (Yamamoto et al., 1999; Barbosa et al., 2008) y se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron en placas de Petri (diámetro = 9 cm) con papel absorbente humedecido con agua destilada, se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por tres días hasta que las raíces de los pastos alcanzaron 1 cm de longitud.

Inoculación de semillas germinadas de *B. decumbens* con HESO: Se colocaron las semillas germinadas en placas de Petri con papel absorbente humedecido, se hizo una herida en la raíz con una lija número 600, se cortaron pedazos de 2 mm de diámetro del borde de la colonia del hongo, y se colocó el fragmento del medio con el hongo sobre la raspadura de la raíz (para que el micelio estuviera en contacto con la raíz) y se incubaron por 24 horas en la oscuridad (tiempo para que el hongo colonizara la raíz). Para los controles se colocaron sobre la raíz fragmentos del medio del cultivo estéril sin inóculo.

Desarrollo experimental: El experimento de sequía fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Suelo ubicado en la Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín. Se utilizó suelo proveniente de la zona bananera de la región del Urabá - Antioquia, se caracterizó con un pH de 5,2, concentración de P (19 ppm), N-NO₃ (10 ppm), N-NH₄ (18 ppm), K (249,6 ppm), Ca (4640 ppm), Al (135 ppm) y Mg (1272 ppm), este se autoclavó dos veces a 121°C y 15 Lb por 20 min y se dejó airear el suelo aproximadamente por 10 min para la eliminación de gases generados en la esterilización. Diez plántulas inoculadas en la raíz con cada uno de los tres hongos y 20 plántulas no inoculadas se plantaron individualmente en vasos desechables (7 onzas) que fueron llenados cada uno con 150 gr del suelo estéril. Todas las plántulas fueron distribuidas completamente al azar en tres pisos de un estante, cada piso tiene dos lámparas fluorescentes. El crecimiento se realizó con fotoperiodos 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad regulados por un timer eléctrico. Las plántulas inicialmente se regaron con 60 mL de agua estéril (capacidad de retención del suelo), luego diariamente dos veces al día se regaron con 5 ml de agua estéril para mantener el suelo húmedo todo el tiempo. Cuando las plántulas tenían 25 días de crecimiento el riego se suspendió por 10 días a todas las plántulas inoculadas con los hongos y a 10 plántulas de las no inoculadas, las otras 10 plántulas no inoculadas se regaron normalmente hasta terminar el experimento.

Variables respuesta

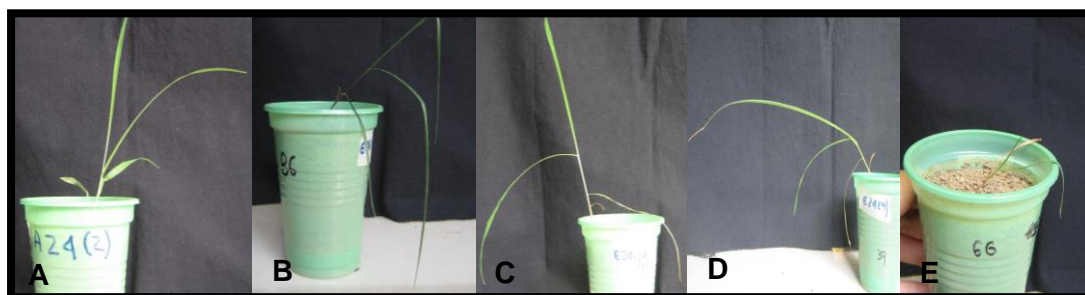
Todas las plántulas fueron cosechadas a los 30 días de haber sido plantadas. Se estimó el peso seco de los componentes de las plántulas a partir de dos ecuaciones de regresión con datos de peso fresco y peso seco, para hojas ($y = 0,192x - 0,180$, $R^2 = 0,845$) y para la raíz ($y = 0,124x + 2,493$, $R^2 = 0,875$). Estas fueron halladas de hojas, tallos y raíces (húmedas y luego secas a 60°C) de 30 plántulas de *B. decumbens* crecidas durante 20 días en el laboratorio de Microbiología de Suelos, usando suelo proveniente de la zona bananera de la región del Urabá – Antioquia, con fotoperiodo 12 horas oscuridad y 12 horas luz natural y riego regular al día de la cosecha. Lo anterior debido a que se necesitarían las hojas y las raíces frescas de las plántulas de los experimentos posteriores para la medición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), Contenido Relativo de Agua en hojas (CRA) y colonización de la raíz. Esas ecuaciones permitieron estimar a partir del peso seco la relación de la biomasa de la parte aérea/radicular.

Variables aéreas

- Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) consistió en el fotoblanqueamiento de las hojas por la exposición a paraquat (herbicida). Se tomaron muestras de tejido de la hoja cuando los síntomas por sequía en las hojas eran leves (enrollamiento de las hojas), se cortaron cuatro fragmentos de 3 x 3 mm de la cuarta o quinta hoja de cada planta, fueron colocados en solución de 1 µM del herbicida Paraquat™ y se incubaron a temperatura ambiente bajo luz fluorescente por 24 - 48 horas, se tomaron fotos: La oxidación de la clorofila fue visualizada por el blanqueamiento de los tejidos, el resultado se reportó como número de fragmentos totales que tuvieron blanqueamiento por tratamiento/número de fragmentos totales utilizados por tratamiento (Rodríguez et al., 2008)
- Contenido relativo de agua en hojas (CRA): Se utilizó la tercera o cuarta hoja completamente expandida, se pesó inmediatamente después de cortada para determinar peso fresco (Pf), se remojó la hoja en agua destilada por 4h en un lugar iluminado, se secó superficialmente con papel absorbente sin presionar y se pesó para determinar peso húmedo o turgencia (Pt), se secó la hoja en horno a 60°C por tres días para determinar peso seco (Ps).

$$\% \text{ CRA} = [(Pf - Ps) / (Pt - Ps)] \times 100$$
 (Kannadan & Rudgers, 2008)
- Síntomas de estrés en hojas: Se realizó seguimiento de las plántulas antes de sequía y después de sequía utilizando la escala de Redman et al., (2011), pero fue modificada para esta especie de planta, donde se evalúa el nivel de clorosis, marchitez y muerte de hojas en cada uno de los tratamientos. Se valoró de 1 a 5 (1 = muerta, 2 = gravemente marchitas y cloróticas, 3 = marchitas + / - clorosis, 4 = poco marchitas y enrolladas, 5 = sanas sin lesiones o marchitamiento). (Figura 1-2)

Figura 1-2. Niveles de síntomas de estrés en hojas, A. Sanas sin lesiones o marchitamiento, B. marchitas y enrolladas, C. marchitas + / - clorosis, D. gravemente marchitas y cloróticas y E. muerta.



Variables radiculares

El sistema radicular de los pastos está compuesto por una raíz primaria que emerge del embrión de la semilla, raíces laterales que emergen contiguas o de la raíz primaria (nombradas en adelante como raíces laterales y secundarias, respectivamente) y raíces adventicias secundarias (nombradas en adelante como raíces adventicias). (Welbaum, 2015)

- Longitud y diámetro de la raíz principal, número, longitud y diámetro de raíces secundarias (se tomaron las raíces comprendidas en una longitud de 3 cm de la raíz principal), laterales y adventicias: Determinadas en imágenes analizadas en el software libre Image J (Rasband, 2007).

- Para determinar si los hongos colonizaron las raíces, se cortaron fragmentos de aproximadamente 1cm de cada réplica de cada tratamiento, se clarificaron y se tiñeron utilizando tinta en vinagre según el procedimiento descrito por Vierhejlig et al., (1998). Se montaron las raíces sobre portaobjetos con cuadrícula, se hicieron conteos de interceptos positivos (presencia de estructuras características de las hifas de cada hongo inoculado) y negativos (no hay presencia de estructuras característica de las hifas del hongo inoculado) hasta obtener 100 conteos en total, esto se realizó usando microscopio OlympusBmax (magnitud 40X) y se tomaron fotos con la cámara digital Celestron modelo 44421, (aumento 15X). El porcentaje de colonización se determinó usando el método de intersecciones de Giovanetti & Mosse (1980).

% Colonización= [Conteos positivos / (Conteos positivos + Conteos negativos)] x100

Análisis estadístico

Se determinó la capacidad enzimática de nueve hongos septados oscuros, por lo que se realizó un ANAVA para las pruebas de amilasas y celulasas, se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianza, y se hizo comparación de medias con la prueba de Tukey. Para la prueba de enzimas proteolíticas y velocidad de crecimiento de los hongos se hizo análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal Wallis (χ^2) debido a que no cumplieron con alguno de los supuestos de normalidad, no se realizó comparación de medianas, y por medio de caja de bigotes se observó el hongo con mayor producción de la enzima proteolítica y los hongos con menor velocidad de crecimiento.

El efecto de la inoculación de tres hongos endófitos septados oscuros (24, 38, 43) y no inoculación con hongos en plántulas expuestas a sequía y no sequía sobre características fisiológicas, microbiológicas y bioquímicas de la planta, se determinó mediante un ANAVA en un diseño completamente al azar con 10 réplicas. Cada replica estuvo constituida por una plántula sembrada en un vaso plástico.

El ANAVA se realizó para las variables respuesta diámetro raíz primaria y contenido relativo de agua en hojas, se evaluó normalidad de los residuales y homogeneidad de varianza, se hizo comparación de medias con la prueba de Tukey. La variable respuesta colonización de raíces, no cumplió con alguno de los supuestos por lo tanto se hizo análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal Wallis (χ^2) y comparación de medianas con la prueba de Dunn. Para las demás variables no se realizó análisis estadístico ya que se presenta una gran variabilidad (desviación estándar) entre las réplicas en cada tratamiento por lo que no permitió determinar si hay diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico libre R

1.5 Resultados

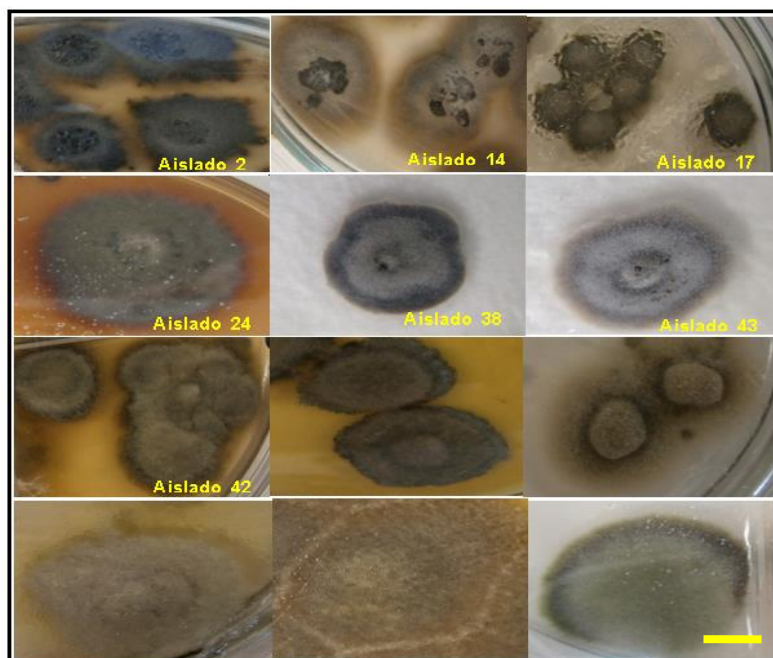
Aislamiento de hongos septados oscuros utilizando diferentes medios de cultivo.

Se obtuvo una colección de HSO de raíces del pasto *B. decumbens* a partir de cuatro medios de cultivo, dos tradicionales PDA (dextrosa) y EM (maltosa), un medio modificado MMN (sacarosa y maltosa) y un medio preparado a partir de extracto de raíz (variedad de azucares).

Para *B. decumbens* se aislaron 84 colonias de hongos de los cuales 53 con características típicas de hongos septados oscuros, como hifas pigmentadas septadas y formación de clamidosporas (Jumpponen & Trappe, 1998) presentando 18 morfotipos diferentes con base en las características del cultivo (color, forma, textura de la colonia, presencia de exudados) y el soma (forma de hifas y formación de estructuras especiales).

Al observar la relación entre el número de HSO y el número total de hongos aislados (Tabla 1-1) los valores son muy parecidos por lo que cualquiera de los medios puede ser bueno para aislar HSO, sin embargo los medios EM y ER pueden ser mejores para obtener mayor proporción de representantes de este grupo.

Figura 1-3. Colonias de hongos septados oscuros escogidas para prueba de recolonización en raíces de *B. decumbens*. Las colonias no marcadas se incluyeron como referencia de la diversidad de colonias aisladas, utilizando diferentes medios de cultivo. Todas las imágenes corresponden a colonias cultivadas en medio PDA con 15 días de crecimiento. Barra = 1 cm.



La técnica de gotas de agar de los medios de cultivo sobre los fragmentos de raíz y placas de Petri divididas en cuadrantes fue un buen método para disminuir la contaminación de los cultivos por bacterias u otro tipo de hongos. Igualmente fue más

fácil observar al microscopio las hifas emergentes de las raíces y este método permite utilizar menos cantidad de medio de cultivo.

Tabla 1-1. Número de colonias de hongos aislados de raíces de *B. decumbens* usando diferentes medios de cultivo.

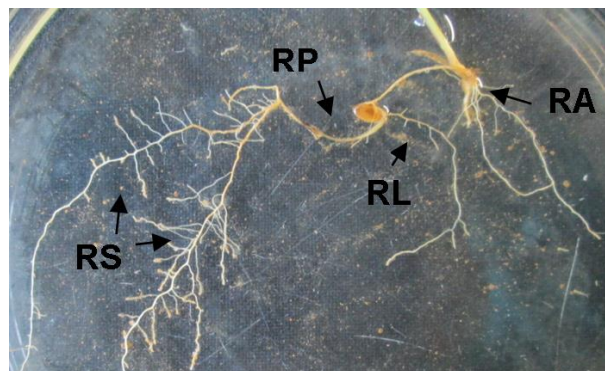
Medio de cultivo	Número hongos aislados.	Número hongos con características de HSO	Número HSO / Número hongos aislados
PDA	29	18	0,6
EM	17	12	0,7
MMN	23	12	0,5
ER	15	11	0,7

Recolonización por hongos septados oscuros aislados en raíces de *B. decumbens*

De 53 colonias de hongos septados oscuros aislados de raíces de *B. decumbens*, se eligieron nueve hongos para realizar la prueba de recolonización en raíces de plántulas del mismo pasto, generalmente estas tenían aspecto saludable, con raíz y plúmula desarrolladas después de seis días de realizar la inoculación de los hongos. Sin embargo algunas semillas estaban invadidas por el hongo y algunas raíces presentaron pudrición por lo tanto fueron descartadas.

En fotografías de las plántulas se realizó la medición de la longitud de la raíz y de la plúmula utilizando el programa Image J, para obtener la relación parte aérea y parte radicular de las plántulas (PA / PR). Debido a que se descartaron algunas plántulas, ya mencionado anteriormente, se presenta como proporción, el número de plántulas con raíces laterales, con raíces secundarias y la relación PA / PR con base en el número de plantas restantes. Todos los hongos inoculados en las raíces presentaron plántulas con raíces laterales (emergen contiguas a la raíz primaria) teniendo mayor proporción el aislado 38 a diferencia del control que no presentó ninguna plántula con segunda raíz. Seis hongos presentaron plántulas con raíces secundarias (emergen de la raíz primaria), con mayor proporción los aislados 14 y 43 (Figura 1-4; Tabla 1-2).

Figura 1-4. Morfología radicular de plántulas de *B. decumbens*. RP: raíz primaria; RS: raíces secundarias; RL: raíz lateral; RA: raíces adventicias. Fotografía: Diana Tamayo



En cuanto a la relación PA / PR con respecto al control se observó que las plántulas inoculadas tuvieron mayor longitud de la plúmula con respecto a la raíz, contrario al control, pero debido a la alta variabilidad entre las réplicas de cada tratamiento no se podría decir que hay diferencias entre los hongos.

Tabla 1-2: Recolonización de hongos septados oscuros y su efecto en la sanidad de las plántulas y en la morfología de las raíces de *B. decumbens*.

Hongo aislado	Plántulas viables	Plántulas con raíz lateral	Plántulas con raíces secundarias	Relación PA/PR
17	8/10	2/8	0/8	4,04 ± 3,74
20	8/10	2/8	0/8	3,96 ± 3,79
42	8/10	1/8	2/8	2,57 ± 3,50
43	10/10	2/10	3/10	2,53 ± 1,29
38	10/10	6/10	1/10	2,34 ± 0,98
14	6/10	3/6	2/6	2,02 ± 0,68
2	8/10	2/8	1/8	1,99 ± 2,32
28	10/10	3/10	0/10	1,82 ± 2,12
24	10/10	4/10	2/10	1,68 ± 0,52
Control	7/10	0/7	0/7	0,29 ± 0,36

Se encontró que en las raíces que no fueron inoculadas (control) tuvieron presencia tanto de hifas hialinas como melanizadas, por lo tanto se trató de identificar morfológicamente las estructuras observadas en las plántulas control y presumiblemente originadas desde las semillas, para diferenciarlas de los hongos inoculados. Solo cuatro hongos por su morfología se pudieron diferenciar de los presentes en el control (Figura 1-5). En ninguno de los hongos inoculados se observó microesclerocios.

Figura 1-5. Sistema de inoculación artificial de hongos septados oscuros en raíces de *B. decumbens*. A. Hongo 24, B. Hongo 38, C. Hongo 43, D. Hongo 28. Barra: 45 μ m.



Evaluación actividad enzimática y velocidad de crecimiento de hongos endófitos septados oscuros

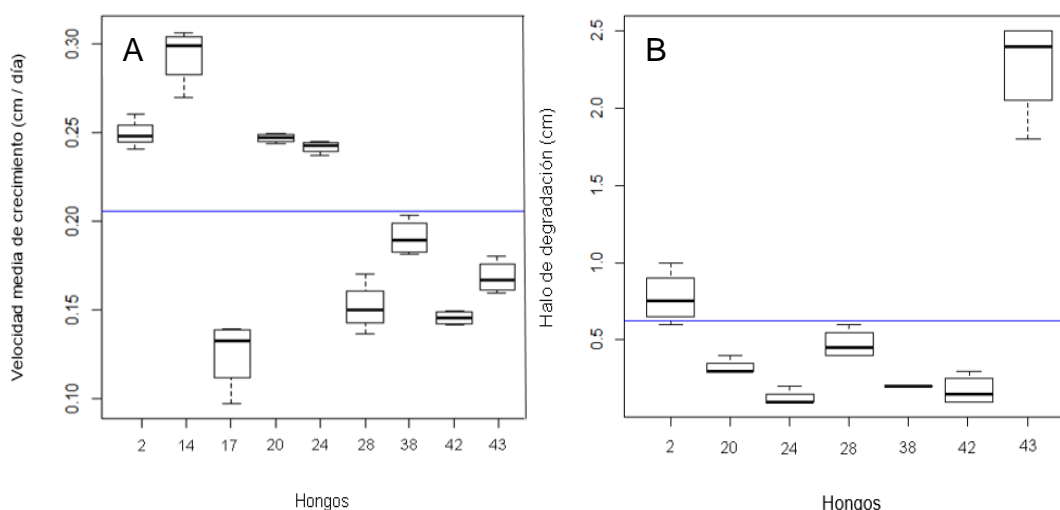
Esta prueba se hizo con el fin de seleccionar hongos con base en diferencias en velocidad de crecimiento y capacidades enzimáticas, para los experimentos siguientes de sequía y baja fertilidad en suelo.

Los hongos aislados 17, 28, 38, 42 y 43 tuvieron menor velocidad media de crecimiento que los hongos aislados 2, 14, 20 y 24, sin embargo se escogió el hongo 38 que se encuentra entre los de menor velocidad de crecimiento (Figura 1-6. A) y fue uno de los pocos que se aislaron del medio extracto de raíz.

Tabla 1-3. Evaluación actividad enzimática y velocidad de crecimiento de hongos septados oscuros. Pigmentación del medio PDA por HESO: Muy intenso (++); leve intensidad (+), no pigmentación (-). Letras en minúscula son para comparación de medias con la prueba de Tukey. Letras iguales indican que no hay diferencia en las medias. Letras diferentes indican diferencia entre sus medias.

Hongo	Velocidad media de crecimiento (cm / día)	Actividad enzimática en medio Halos de degradación (cm)			Pigmentación del medio PDA por HSO
	PDA	Almidón	CMC	Gelatina	
2	0,2507	0,9 <i>ef</i>	1,3 <i>a</i>	0,8	-
14	0,2896	2 <i>bc</i>	1,3 <i>bcd</i>	0	-
17	0,1478	5,1 <i>a</i>	1,5 <i>abc</i>	0	-
20	0,2438	1,3 <i>de</i>	1,2 <i>cd</i>	0,3	-
24	0,2443	0,6 <i>f</i>	1 <i>d</i>	0,1	++
28	0,1533	1,4 <i>cd</i>	1,1 <i>d</i>	0,5	+
38	0,1877	1,3 <i>cde</i>	1,1 <i>d</i>	0,2	+
42	0,1454	2,3 <i>b</i>	0	0,2	-
43	0,1689	1,6 <i>bcd</i>	0,4 <i>ab</i>	2	-

Figura 1-6. Evaluación de hongos septados oscuros aislados de raíces de *B. decumbens*, A. Velocidad de crecimiento en medio PDA, B. Actividad enzimática en medio con gelatina. Prueba Kruskal-Wallis. Línea horizontal azul muestra la media general de los tratamientos.



Solo tres hongos pigmentaron el medio PDA, siendo el de mayor intensidad el hongo 24 (Tabla 1-3). En las pruebas enzimáticas el hongo 43 tuvo mayor diámetro en el halo de degradación, así que hubo una alta capacidad de producción de enzimas proteolíticas en medio con gelatina (Figura 1-5, B). Para el medio con almidón el hongo 17 es el que tuvo mayor capacidad para producir amilasas, en el medio CMC no hubo ningún hongo que se destacara en la producción de celulasas (Tabla 1-3). Los aislados de HESO generalmente tienen una coloración entre cafés, grises y negros, colores característicos de los hongos productores de pigmentación. Por consiguiente los hongos escogidos para los experimentos posteriores fueron el 24, 38

y 43, que formaron colonias color café oscuro o gris (Figura 1-7). No se escogieron los hongos 14 y 17, ya que el 14 pareció formar cleistotecios en la raíz, indicativos probables de ser un hongo patógeno para el pasto.

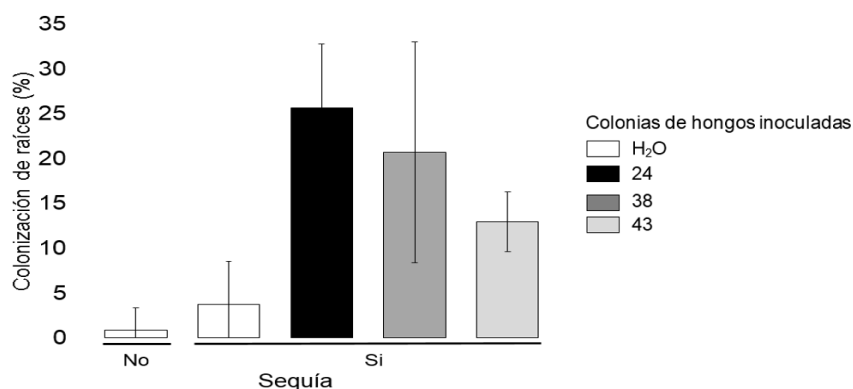
Figura 1-7. Colonias de hongos endófitos septados oscuros en medio PDA y aisladas de raíces de *B. decumbens*.



Evaluación de los hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia de plántulas de *B. decumbens* a sequía.

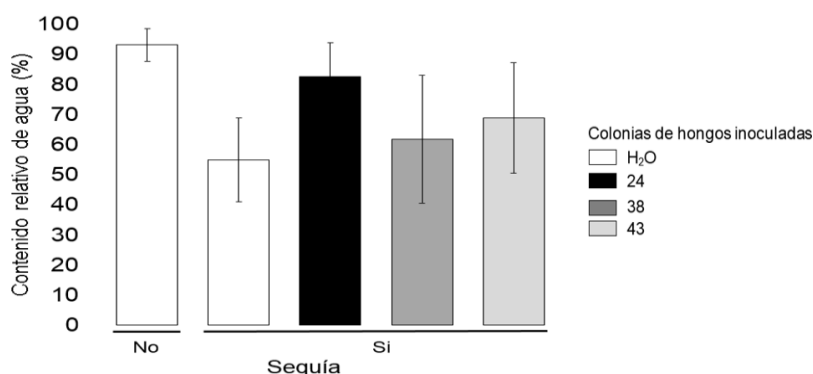
Contrario a lo esperado, se observó que los HESO inoculados en las raíces de las plántulas de *B. decumbens* no mostraron un efecto evidente en la tolerancia del pasto a condiciones de sequía extrema, ya que se presentó una gran variabilidad entre las réplicas en cada tratamiento por lo que no permitió determinar si hay diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, se observó que la sequía tuvo un efecto significativo en las variables contenido relativo de agua en hojas y en el diámetro de la raíz primaria. Al evaluar la colonización de las raíces por los HESO se encontró que las plántulas que no fueron inoculadas con los hongos y que estuvieron expuestas a niveles de sequía, también presentaron estructuras típicas de los HESO.

Figura 1-8. Colonización de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en las raíces de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=10 en cada tratamiento).



En general se podría decir que los hongos inoculados colonizaron las raíces, ya que se observaron las mismas estructuras que en la prueba de recolonización. Pero se encontró también que había colonización de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de plantas no inoculadas con hongos tanto en sequía como no sequía, siendo alrededor del 20% para sequía y 22% para no sequía. Nivel significativamente menor que la colonización tanto del hongo 24 (Si y No sequía $p < 0.01$) como del hongo 38 (Si sequía $p = 0,024$ y No sequía $p = 0,0054$). Ninguno de los tratamientos alcanzó un porcentaje de colonización mayor al 35% (Figura 1-8),

Figura 1-9: Efecto de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en el contenido relativo de agua en hojas de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=10 en cada tratamiento).



Para el contenido relativo de agua en hojas, las plántulas que no fueron inoculadas y no estuvieron en sequía fueron significativamente mayores en un 38% que las no inoculadas y en sequía, como también significativamente mayores en un 31% ($p = 0,0013$) y 24% ($p = 0,017$) que las inoculadas con los hongos 38 y 43 en sequía respectivamente. Mientras que las inoculadas con el hongo 24 fueron 27%, significativamente mayor que las plántulas no inoculadas y en sequía ($p = 0,0036$) (Figura 1-9).

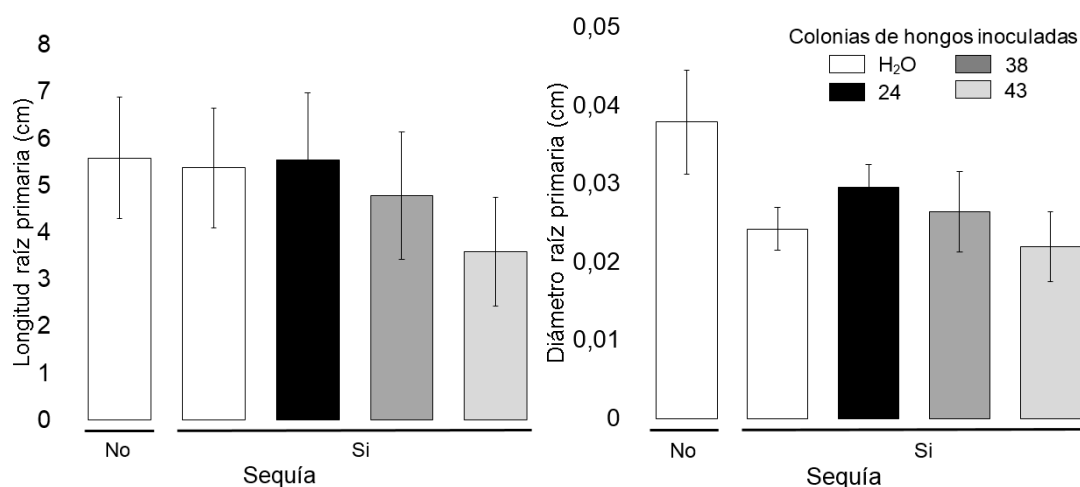
Tabla 1-4: Producción de especies reactivas de oxígeno en hojas de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía e inoculadas con los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43. Detección por exposición a Paraquat™ y fotoblanqueamiento.

Tratamientos		Número fragmentos de hojas de <i>B. decumbens</i> blanqueadas por paraquat x tratamiento	
Sequía	Inoculación	24 horas	48 horas
No	H ₂ O	13/40	28/40
Si	H ₂ O	0/40	32/40
Si	Hongo 24	8/40	32/40
Si	Hongo 38	9/40	23/40
Si	Hongo 43	0/40	28/40

Fragmentos de hojas de las plántulas inoculadas y no inoculadas con los hongos bajo condiciones de sequía y sin sequía fueron expuestas a Paraquat™ para analizar la

sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno (ERO). Hubo mayor cantidad de fragmentos fotoblanqueados (oxidación de la clorofila) en plántulas no inoculadas con hongos y no expuestas a sequía, que en los demás tratamientos a las 24 horas de expuestas las hojas al Paraquat™. A las 48 horas tanto las plántulas no inoculadas y en sequía, como las plántulas inoculadas con el hongo 24 y en sequía tuvieron mayor cantidad de fragmentos fotoblanqueados y en menor cantidad las plántulas inoculadas con el hongo 38 en sequía (Tabla 1-4).

Figura 1-10: Efecto de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en la longitud y diámetro de la raíz primaria de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=10 en cada tratamiento).



No hubo efecto de los hongos en la longitud de la raíz primaria (Figura 1-10). Pero su diámetro si fue significativamente mayor en plántulas no inoculadas y no expuestas a sequía, Este incrementó en 0,0083 cm para las plántulas inoculadas con el hongo 24 ($p = 0,004$), 0,011 cm para el hongo 38 ($p = 0,00016$) y 0,016 cm para el hongo 43 y sometidas a sequía, también se vio significativamente afectado el diámetro en las plántulas no inoculadas y en sequía en 0,014 cm.

Tabla 1-5: Síntomas de estrés en hojas de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía e inoculadas con los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43. (n=10 en cada tratamiento).

Tratamientos		Proporción de plantas con síntomas de sequía en hojas (10 días de sequía)		
Sequía	Inoculación	Plegadas	Marchitas y Cloróticas	Muertas
No	H ₂ O	1/9	0/9	0/9
Si	H ₂ O	7/9	2/9	6/9
Si	Hongo 24	4/8	0/8	1/8
Si	Hongo 38	5/7	0/7	1/7
Si	Hongo 43	5/7	1/7	0/7

Las plántulas empiezan a mostrar síntomas de sequía a los siete días con hojas plegadas inicialmente. A los diez días de sequía, la mayor cantidad de plántulas afectadas con hojas plegadas, marchitas, cloróticas y muertas fueron las que no se inocularon con los hongos y se sometieron a sequía, respecto a los demás tratamientos. (Tabla 1-5).

En las demás variables medidas: peso seco aéreo y radicular, relación peso seco aéreo / radicular, longitud de las raíces primarias, secundarias y adventicias, número de raíces secundarias, número y diámetro de raíces adventicias (Anexo 1, 2 y 3) no se encontraron diferencias entre la inoculación de las plántulas con HESO y los controles que no fueron inoculados y sometidas o no a sequía.

1.6 Discusión

Aislamiento de hongos septados oscuros utilizando diferentes medios de cultivo.

Los medios EM y ER parecen favorecer la obtención de mayor diversidad de hongos septados oscuros. El medio ER es un medio con una gran variedad de sustratos, tal vez la concentración de ellos hace que estos hongos emerjan mucho más lento, como también la presencia de ciertos carbohidratos puede determinar la diversidad de endófitos presentes, como sucede en Hadacek & Kraus, (2002). Estos autores observaron que los endófitos utilizaban los carbohidratos de la planta huésped de forma más eficiente a concentraciones más bajas.

Los exudados de la raíz incluyen azúcares y polisacáridos simples que normalmente son los utilizados en medios de cultivo (glucosa, sacarosa, maltosa y otros). En raíces de los pastos los azúcares que se encuentran en mayores cantidades son la sacarosa y la fructosa, sin embargo, la glucosa es uno de sus azúcares principales (Steen & Larsson, 1986), por lo que se puede relacionar la afinidad de los hongos septados oscuros por el medio comercial extracto de malta (Maltosa disacárido de glucosa). Sin embargo el medio PDA es donde estos hongos tuvieron mayor velocidad de crecimiento similar a lo que sucedió con el experimento realizado por Lv, (2010) y colaboradores, este medio tiene una base altamente nutritiva como la infusión de papa que promueve el crecimiento micelial abundante de los hongos en poco tiempo.

Adicionalmente, la técnica utilizada de Silvani et al., (2008) para aislar hongos septados oscuros, con gotas de agar de los medios de cultivo sobre los fragmentos de raíz y placas de Petri divididas en cuadrantes, puede ser un buen método para disminuir la posibilidad de que los cultivos se contaminen por bacterias u otro tipo de hongos, y además facilita observaciones al microscopio de las hifas emergentes de las raíces. También permitió usar menor cantidad de medio de cultivo.

Recolonización por hongos septados oscuros aislados en raíces de *B. decumbens*

Los nueve hongos de morfotipos diferentes mostraron su capacidad endofítica de colonizar la raíz nuevamente y formar estructuras características de los HESO, sin embargo se encontró que las plántulas que no fueron inoculadas (control) tenían hifas hialinas y melanizadas en las raíces, aunque en muy poca cantidad, por lo que se trató de identificar morfológicamente las estructuras observadas en las plántulas

control y diferenciarlas de los hongos inoculados que se encontraban en mayor cantidad. La esterilización superficial de las semillas no es suficiente para garantizar que estas estén totalmente libres de endófitos.

De los hongos inoculados cuatro se pudieron diferenciar mejor de los presentes en el control (Figura 1-5). Las hifas de estos hongos son melanizadas, septadas y crecen en paralelo al eje principal de la raíz sin causar distorsión de las raíces, pero no se observaron microesclerocios. Estos hongos produjeron diferentes efectos en la fisiología de la planta como en la morfología de la raíz, ya sea en mayor proporción de plántulas con raíces secundarias como el aislado 43 o raíces laterales como el aislado 38, mientras que el aislado 14 presentó mayor número de plantas muertas. El aislado 14, aunque colonizó el interior de la raíz se observó una estructura similar a un cleistotecio, por lo que se podría pensar que es un hongo patógeno para el pasto. De manera general todas las plántulas inoculadas con los hongos benefician el crecimiento de la plúmula más que de la raíz. Esta diferencias en el crecimiento de la planta de acuerdo a Rodríguez et al., (2009a) puede ser debido a que los endófitos pueden tener efecto en la regulación del crecimiento y establecimiento inicial de plántulas mediante la mayor asignación de recursos a ciertas partes de la planta. Rodríguez & Rodríguez, (2006) mencionan que la asignación de los recursos a la raíz o al vástago se puede cumplir en respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes, agua, CO₂ o luz.

Evaluación actividad enzimática y velocidad de crecimiento de hongos endófitos septados oscuros

Estas variables se utilizaron como criterio fenotípico simple para diferenciar colonias de hongos en una condición artificial estándar. Sin embargo no permite especular sobre su funcionalidad en la raíz.

Por el contrario al evaluar la capacidad enzimática de los hongos, no solo se diferencian fisiológicamente, si no que da una idea de su potencial para acceder a detritos presentes en el suelo y obtener nutrientes como C, N y P, que pueden ser transferidos a la planta. En Mandyam & Jumpponen, (2005) a partir de diferentes revisiones, reportaron las capacidades enzimáticas de los HESO, entre ellas se encuentran celulasas, amilasas, enzimas proteolíticas, lacasas, pectinasas entre otras. En nuestro experimento los hongos evaluados no presentaron alta actividad para amilasas y celulasas mientras que en Mandyam et al., (2010) muestran gran capacidad de los HSO para producir estas enzimas, sin embargo se rescata la evidente actividad proteolítica, mayor del hongo 43, que podría resultar en mayor capacidad para adquirir carbono y nitrógeno de detritos. El hongo 24 mostró la capacidad de pigmentar el medio PDA. Esa producción de melanina se asocia a actividad antioxidante y es utilizada como protección en ambientes extremos (Zhan et al., 2011).

Evaluación de los HESO en la tolerancia de plántulas de *B. decumbens* a sequía.

La gran variabilidad que se dio entre las plántulas en cada tratamiento no permitió determinar los efectos significativos de los hongos en la tolerancia de *B. decumbens* a la sequía. Estos resultados pudieron deberse a que tanto las plántulas controles como las que fueron inoculadas presentaron hongos endófitos septados oscuros. Aunque los controles tuvieron mucho menos colonización en la raíz, su comportamiento fue el mismo al de las plántulas inoculadas. Esto pudo ser posiblemente a que hubo inoculación cruzada en el laboratorio, que tal vez no fue posible de controlar o a que las semillas ya venían infectadas desde el inicio del experimento.

Sin embargo, se observó que la sequía tuvo un efecto significativo en las variables contenido relativo de agua en hojas y en el diámetro de la raíz primaria, mostrando que la sequía afecta el diámetro de la raíz principal, mientras que en el contenido relativo de agua en hojas puede ser positivo para las plántulas ser inoculadas con este grupo de hongos cuando están bajo sequía. De manera similar ocurrió en plantas de fresa inoculadas con *Pirifomospora indica* (Husaini et al., 2012), como también puede ser positivo de manera general en la salud del pasto inocularlos con los hongos endófitos septados oscuros. Es necesario un buen control experimental libre de endófitos, para pasar de las especulaciones a las demostraciones.

La inoculación con los aislados 38 y 43 pudo estar asociado a la menor producción de especies reactivas de oxígeno, según la prueba con Paraquat™, ya que presentaron indicios de presencia de enzimas antioxidantes activadas por el hongo (Sun et al., 2010), estas pueden permitir la trasmisores de señales de estrés a la planta. De esta manera el pasto evita la muerte celular de las hojas, como también la presencia de patógenos.

Hay que tener en cuenta que en los estudios tanto con hongos septados oscuros como con endófitos se han incluido plantas control, libres de endófitos (Cheplick , 2004; Rodríguez et al., 2008) y la eliminación de estos hongos la hacen por desinfección superficial de las semillas con algún producto químico como etanol, hipoclorito o fungidas y verifican su efecto a través de tinciones de tejido de la planta (Kannadan & Rudgers, 2008), por siembra de las semillas (Andrade-Linares et al., 2011) o de tejido en agar (Bayman et al., 2002). Sin embargo en Barrow et al, (2004), micro propagaron dos pastos con el fin de eliminar los hongos septados oscuros, pero este método no tuvo efecto, encontraron hongos endófitos tanto en estructuras aéreas como en raíces, también sugieren que muchos de estos hongos no pueden ser cultivados independientemente de la planta, es decir estos hongos están asociados fuertemente con los tejidos del huésped, por lo que tratar de aislarlos en medio de cultivo para evaluar si las técnicas de eliminación fueron efectivas, ocasionaría resultados errados.

Así que es necesario buscar otras alternativas de eliminación de hongos endófitos de las plantas y técnicas que nos permitan cerciorarnos de manera segura que las plantas están libres de endófitos y así obtener resultados más evidentes de los efectos de estos hongos en las plantas bajo condiciones extremas.

En experimentos futuros se podrían realizar estudios de hongos endófitos septados oscuros con plantas modelos como *Arabidopsis* que están libres de hongos endófitos aunque es posible que no se puedan generalizar esos resultados a otros tipos de plantas.

1.7 Conclusiones

La presencia de HESO en plántulas control y la gran variabilidad que se presentó en cada tratamiento tanto en plantas inoculadas y no inoculadas en sequía y en no sequía, no permitió determinar el efecto de los HESO en la tolerancia del pasto *B. decumbens* a la condición extrema de sequía.

El uso de medios de cultivo con diferentes fuentes de azúcares permitió obtener una gran variedad de hongos septados oscuros de raíces de *B. decumbens*, siendo los mejores medios el extracto de malta (EM) y extracto de raíz (ER). La utilización de la técnica de gotas de agar disminuyó la contaminación del medio y el uso excesivo de medio de cultivo.

Los hongos aislados mostraron formar estructuras típicas de los HESO en la recolonización en raíces de *B. decumbens*, sin embargo las plántulas que no fueron inoculadas (control) tenían hifas hialinas y melanizadas en las raíces pero en muy poca cantidad, así que la esterilización superficial de las semillas no es suficiente para garantizar que las raíces estén totalmente libres de endófitos.

La velocidad de crecimiento de los hongos y la capacidad enzimática de los HESO fueron una buena manera de seleccionar y diferenciarlos para los experimentos posteriores.

2. Evaluación de métodos rápidos para eliminación de hongos endófitos en raíces de *Brachiaria decumbens*.

2.1 Resumen

La adaptación de plantas a condiciones ambientales extremas puede depender de la asociación con hongos endófitos de raíces. Sin embargo, las demostraciones del papel de esos endófitos en las simbiosis son limitadas si no se experimenta con plantas libres de ellos. Este estudio adaptó y evaluó un sistema de germinación masivo de semillas (SGMS) que permite probar métodos de desinfección de raíces de *B. decumbens* en estudios con hongos endófitos. El sistema construido utiliza elementos de uso común bolsas de polipropileno transparentes, pinzas metálicas, carpetas oscuras y papel absorbente. Con él se evaluaron en semillas métodos de desinfección externa (NaOCl al 5%, calor, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 7,14%) e interna (Captan™ y Benomil 50WP (0,1 mg/ml)). El SGMS fue adecuado para el desarrollo de plántulas de *B. decumbens* ya que en cinco días se obtiene abundante material de trabajo (7 a 10 semillas con raíces principales por bolsa, con longitudes promedio de $4,6 \pm 0,8$ cm). Adicionalmente, los tres métodos de desinfección externa en semillas no eliminaron completamente bacterias y hongos cultivables de las semillas al compararse con el tratamiento control (agua). La aplicación NaOCl al 5% presentó la mayor germinación y desarrollo de semillas por bolsa. Sin embargo, los fungicidas y el calor para desinfección interna no eliminaron las estructuras internas de hongos de las raíces como se evidenció en análisis al microscopio, lo que sugiere una relación innata planta–endófito en pasto *B. decumbens*, que impide obtener plantas libres de endófitos. Algunas implicaciones experimentales son presentadas y discutidas a la luz de estos resultados.

Palabras clave: Bolsas de germinación, hongos endófitos, métodos de desinfección, pastos, simbiosis.

2.2 Abstract

Plant adaptation to extreme conditions of soil fertility and climate may be highly dependent on fungal symbiosis. However research on this topic is hampered by the difficulties to obtain plant propagation materials free of endophytes. This study adapted and tested a system of massive germination of seeds (SGMS) of *Brachiaria decumbens* which allows evaluating root disinfection methods for experimental purposes with this important tropical grass. The system called germination bags used inexpensive, locally available materials such as polypropylene clear bags, metallic clips and paper towel. Using seeds, this system evaluated external (5% NaOCl, heat, 7,14% Ca(ClO)₂) and internal (Captan™ and Benomyl 50WP (0,1 mg/ml)) disinfection methods. The results indicated that our SGMS is suitable for the development of *B. decumbens* seedlings and yields abundant working plant material in five days (7 to 10 rooted seeds per bag with average lengths of 4,6 ± 0,8 cm). In addition, the three external disinfection methods for seeds did not fully eliminate cultivable bacteria and fungi, as compared to a control treatment (water). Using 5% NaOCl showed the highest germination rate of seeds per bag. Fungicide and heat used as internal disinfectants did not eliminate root fungal internal structures as evidenced by microscopic root analysis, suggesting an innate plant-endophyte relationship on *B. decumbens* grass that prevents to study plants without the presence of endophytes. Further experimental consequences of these results are discussed.

Keywords: Germination bags, fungal endophytes, disinfection methods, grasses, symbiosis.

2.3 Introducción

Muchas especies vegetales forman algún tipo de simbiosis con hongos endófitos y micorrizas, que proveen beneficios nutricionales y tolerancia a condiciones ambientales adversas (Rodríguez et al., 2004). *Brachiaria decumbens* es un pasto muy cultivado en los sistemas de producción ganadera en el trópico alto y bajo de Suramérica. Evaluaciones preliminares indican la presencia de hongos septados oscuros en este pasto, pero no se conoce el papel de estos hongos en sus raíces. Estos hongos son un grupo misceláneo en su mayoría del filo Ascomycota, poseen hifas melanizadas y septadas, forman estructuras densas septadas llamadas microesclerosios (Jumpponen & Trappe, 1998). Generalmente se encuentran en ambientes estresados como en áreas de alta temperatura y suelos secos (Porrás et al., 2008; Knapp et al., 2012), como también en zonas de baja temperatura (Newsham et al., 2009).

Entender el papel de esa simbiosis en condiciones naturales es prerequisite para su aprovechamiento en la conservación y producción vegetal. Henry et al., (2006) afirma que es necesario contar con sistemas axénicos de cultivo de plantas, para asegurar que las respuestas se deben en sí a los tratamientos aplicados y no a condiciones de crecimiento no adecuado para las plantas. Para superar esta dificultad se han desarrollado diversos sistemas de propagación controlada para obtener gran cantidad de plántulas en menor tiempo y libres de microorganismos. Allí se emplean en condiciones estériles estacas o semillas (Alarcón & Ferrera-Cerrato, 1999) sembradas en medios de crecimiento líquidos (cultivos hidropónicos) (Groleau-Renaud et al.,

1998), sólidos porosos (Henry et al., 2006), agares (Heist et al., 2002), arena (Henry et al., 2006), arcilla (Biondini, 1988) y/o perlas de vidrio (Sandnes & Eldhuset, 2003).

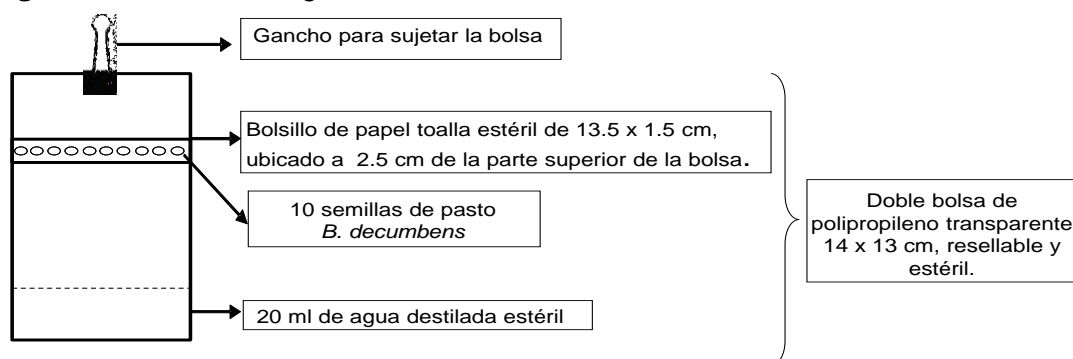
Entre los métodos de desinfección más usados se encuentran la irradiación gama o el autoclavado de todos los componentes del sistema a emplear o del medio de crecimiento (Henry et al., 2006). Para desinfección externa de semillas se han utilizado métodos térmicos (Misaghi & Donndelinger, 1990; Kannadan & Rudgers, 2008) o inmersión en soluciones diluidas de etanol (C₂H₆O) (Ernst et al., 2003), hipoclorito de sodio (NaOCl) (Simons et al., 1996), hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂) (Knudson, 1929), ácido sulfúrico (H₂S₄) (Hepper, 1981). Para desinfección interna de raíces se usan fungicidas de acción sistémica, de contacto, o traslaminar (Latch & Christensen, 1982; Gibert & Hazard, 2011; Barney, 2003; Ernst et al., 2003). El uso de calor es una de las técnicas más utilizadas para eliminar hongos endófitos en pastos por exposición a diferentes tiempos y grados de temperatura (Latch & Christensen, 1982; Wali & Saikkonen, 2011), ya sean en hornos de convección (Kannadan & Rudgers, 2008) o por inmersión de semillas en baños de agua (Wali et al., 2011). No obstante, la no especificación de pruebas de verificación de la desinfección del material vegetal en algunos estudios (Mergulhao et al., 2001; Redman et al., 2002) o el uso de métodos de verificación poco rigurosos deja dudas acerca de si el material vegetal empleado estaba realmente limpio al momento de tomar variables de interés como la capacidad de colonización de los hongos endófitos, el efecto fisiológico sobre las plantas o su potencial en la adaptación de las plantas a condiciones extremas de fertilidad de suelo y clima. En cualquier caso, es necesario obtener un gran número de plantas si se desea evaluar en poblaciones de ellas y en condiciones semi-controladas los efectos de hongos simbioses en raíces. Hasta el presente no existe un método económico y rápido para ello. El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema de germinación masiva de semillas de *B. decumbens* que permitiera evaluar métodos de desinfección de raíces bajo condiciones de laboratorio y obtener plántulas libres de endófitos para ser usadas en experimentos posteriores.

2.4 Materiales y Métodos

Sistema de germinación masiva de semillas de *B. decumbens*.

Este sistema se adaptó a partir del presentado inicialmente por Kloeper & Schroth, (1981) en bolsas de crecimiento, y fue modificado según la descripción detallada en la Figura 2-1.

Figura 2-1. Sistema de germinación masiva de semillas de *B. decumbens*.



En una prueba inicial se determinó la efectividad del sistema para germinación de semillas y desarrollo inicial de plántulas de *B. decumbens* en condiciones estériles. Se utilizaron semillas comerciales (Agrosemillas, lote: R044/12, pureza: 95,1%) sometidas a dos condiciones de temperatura alterna (24 horas a 4°C y 96 horas a temperatura ambiente) y continua (120 horas a temperatura ambiente)) en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones. Cada repetición estuvo constituida por una bolsa de germinación con 10 semillas (Figura 2-1). En el laboratorio, después de aplicar los tratamientos, las bolsas se colgaron del borde superior (usando ganchos) en carpetas plásticas oscuras y se mantuvieron tres días en oscuridad y luego dos días en períodos alternos de 12 horas oscuridad y 12 horas luz natural indirecta incidente solo sobre el borde superior de la bolsa. Las variables medidas fueron: germinación de semillas (%) y crecimiento de raíces (cm) cinco días después de iniciada la prueba. Se utilizó una prueba t de student para comparar los promedios de las variables en los dos tratamientos.

Efectividad de métodos para la desinfección externa e interna de semillas de *B. decumbens*

Desinfección externa de semillas.

Se tomaron conjuntos de 40 semillas que se sometieron a tratamientos previamente presentados en la literatura: NaOCl al 5% (Simons et al., 1996), Calor (Misaghi & Donndelinger, 1990), Ca(ClO)₂ al 7.14% (Knudson, 1929) y agua destilada estéril (control).

Se registró la actividad microbiana residual en la superficie de la semilla, es decir, se determinó si hubo microorganismos que sobrevivieron después de estar expuestos por cierto tiempo al agente desinfectante. Se colocaron las semillas en placas petri con agar PDA, se incubaron en oscuridad a 25°C por tres días y después de 24 y 72 horas se registró en cada tratamiento el número de semillas rodeadas por unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos o bacterias.

Combinación de desinfección externa e interna de semillas.

Consistió en cuatro experimentos independientes. En cada uno se evaluó un método de desinfección externa de semillas, combinado con dos tratamientos para desinfección interna (fungicidas) o un control con agua. Cada experimento utilizó un diseño completamente al azar y 10 repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por una bolsa de germinación con 10 semillas de *B. decumbens* (Figura

2-1), que se incubó por cinco días en las mismas condiciones descritas arriba. Los métodos de desinfección evaluados se presentan en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1. Métodos de desinfección externa e interna de semillas de *B. decumbens*.

Experimento	Método de desinfección externa	Métodos de desinfección interna *
I	NaOCl al 5% (Simons et al., 1996)	<ul style="list-style-type: none"> • Fungicida Captan™ • Fungicida Benomil 50WP • Agua destilada estéril (control)
II	Calor (Misaghi & Donndelinger, 1990)	
III	Ca(ClO) ₂ al 7.14% (Knudson, 1929)	
IV	Agua destilada estéril (testigo)	

*Los fungicidas Captan y Benomil se emplearon a una concentración de 0.1mg/ml y se adicionaron al agua de las bolsas de germinación correspondientes.

Variables respuesta

Germinación de semillas (%).

Longitud de raíces (cm) determinada en imágenes analizadas en el software libre ImageJ (Rasband, 2007).

Actividad microbiológica interna de las semillas, que consistió en colectar de cada réplica las raíces con al menos 1cm de longitud, desinfectarlas para prevenir cualquier contaminación externa (etanol al 95% 1 minuto, agua destilada estéril 10 segundos, NaOCl al 2.5% 1 minuto, agua destilada estéril 2 minutos), secar sobre papel toalla estéril, cortar en fragmentos de aproximadamente 1 cm, y finalmente teñir empleando la metodología propuesta por Vierheilig et al., (1998). Se consideró una raíz colonizada cuando al menos un fragmento presentaba estructuras de hongos. Los datos se presentan como relación entre el número de raíces positivas y el total de raíces presentes en cada réplica. El método de tinción empleado no permitió diferenciar claramente las diferentes estructuras formadas por los hongos endófitos en raíces, por tal motivo se decidió usar la tinción dual modificada de Barrow, (2003) en el experimento siguiente.

Desinfección externa (NaOCl al 5%) e interna (calor a diferentes tiempos) de semillas

Consistió de cinco tratamientos de desinfección por calor donde las semillas que se desinfectaron externamente con NaOCl al 5% se sometieron a 60°C en tiempos diferentes (10, 20 y 30 minutos en baño de agua o 6 días en horno) y un control a temperatura ambiente. Se utilizó un diseño completamente al azar, cada tratamiento con cinco repeticiones conformadas por una bolsa de germinación con diez semillas de *B. decumbens* (Figura 2-1), que se incubó por ocho días en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Variables respuesta

Germinación de semillas (%).

Longitud de raíces y plúmula (cm) determinadas en imágenes analizadas en el software libre Image J (Rasband, 2007).

Actividad microbiológica interna de las semillas (%) mediante tinción dual de raíces modificada de Barrow (2003). Porcentaje de colonización mediante el método de las intersecciones de Giovanetti & Mosse (1980) considerando como positiva la presencia de estructuras del hongo como hifas, esporas, cuerpos lipídicos y estructuras atípicas mencionadas por Barrow (2003) como protoplastos, sin pared distinguible o con paredes muy delgadas hialinas y de difícil detección por tinciones para quitina fúngica.

$$\% \text{ Colonización} = [\text{Conteos positivos} / (\text{Conteos positivos} + \text{Conteos negativos})] \times 100$$

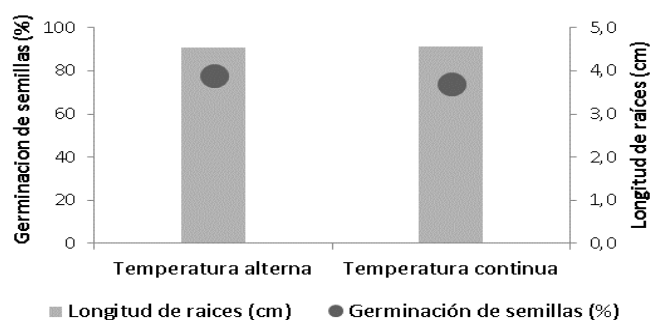
Para el análisis estadístico se revisaron los supuestos de normalidad de residuales y homogeneidad de varianzas previo al ANAVA, se hizo comparación de medias con la prueba de Tukey, para la variable longitud de raíz se hizo transformación (logaritmo) para cumplir con los supuestos del ANAVA. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico libre R (www.r-project.org).

2.5 Resultados

Desempeño del sistema de germinación masiva de semillas de *B. decumbens*.

Cinco días después de iniciada la prueba se obtuvieron 7 a 10 semillas germinadas en cada bolsa, con longitudes promedio en raíces de $4,6 \pm 0,8$ cm. En esta prueba no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos de temperatura evaluados (Figura 2-2). En general, el desarrollo de plántulas fue adecuado y el uso de bolsas transparentes dentro de carpetas oscuras permitió realizar observaciones periódicas sin interrumpir el desarrollo del experimento.

Figura 2-2. Germinación de semillas y longitud de raíces después de los tratamientos con temperatura alterna o continua.

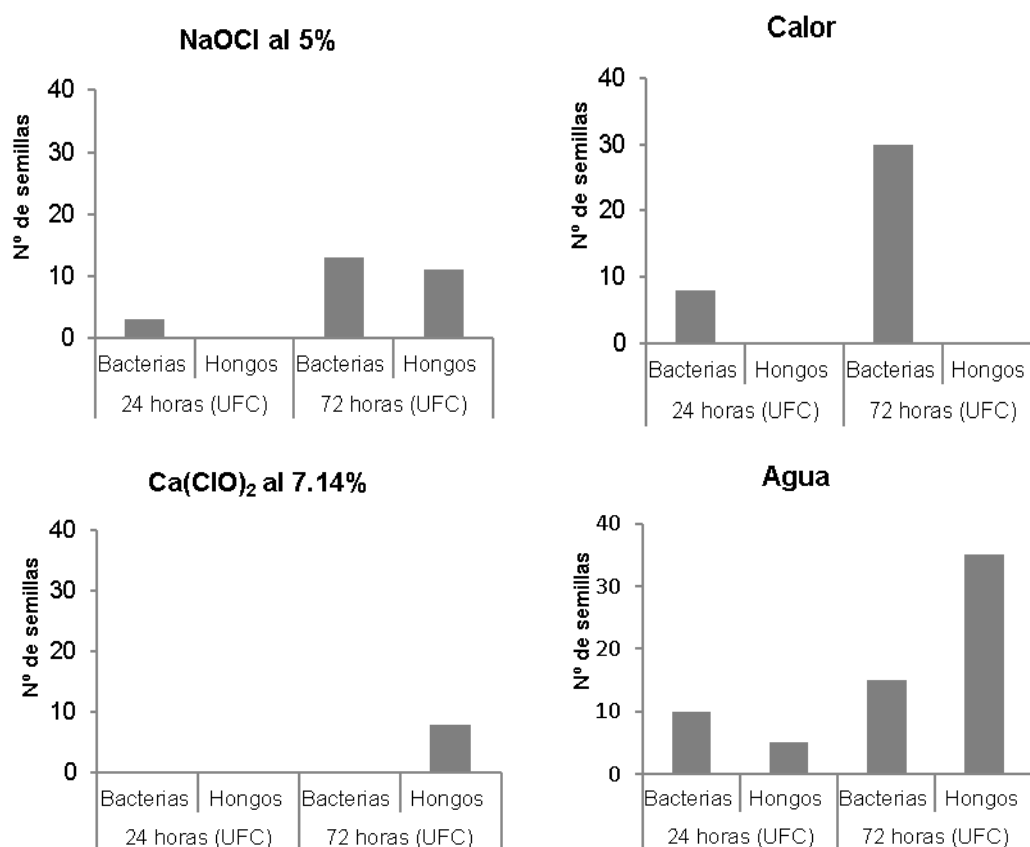


Efectividad de métodos para la desinfección externa e interna de semillas de *B. decumbens*

Desinfección externa de semillas.

Los tres métodos de desinfección externa disminuyeron diferencialmente la actividad microbial residual superficial en semillas, en comparación con el tratamiento control con aplicación de agua. En general se observó que ningún tratamiento individual fue completamente efectivo para eliminar simultáneamente bacterias y hongos cultivables durante todo el período de evaluación de las semillas. Por ejemplo el tratamiento con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ eliminó bacterias superficiales, mientras que el tratamiento con calor eliminó hongos (Figura 2-3).

Figura 2-3. Actividad microbial residual 24 y 72 horas después de aplicar métodos de desinfección externa en semillas de *B. decumbens*.



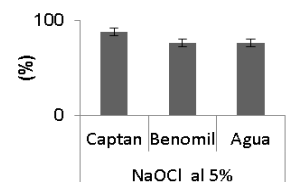
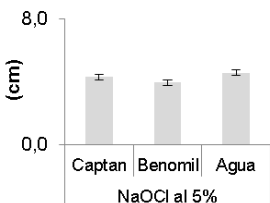
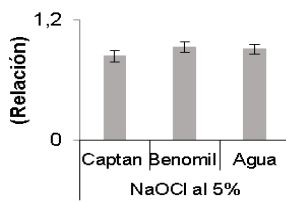
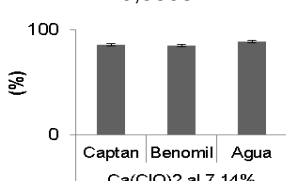
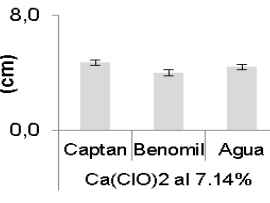
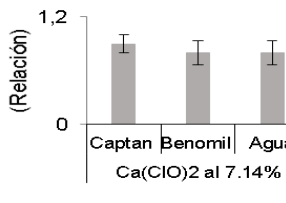
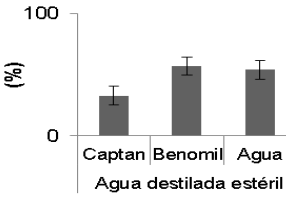
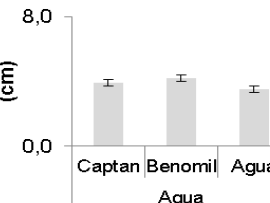
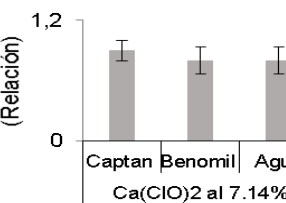
Actividad microbial residual

Combinación de desinfección externa e interna de semillas.

La germinación de semillas fue afectada diferencialmente por los métodos de desinfección externa. La aplicación de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ o NaOCl ($p = 0,0022$) en semillas resultó en niveles de germinación superiores a 70%. Por el contrario, en el tratamiento con calor las semillas no germinaron (Figura 2-4).

Al combinar la aplicación de Captan con NaOCl se incrementó significativamente la germinación, aunque este efecto no se observó al aplicarlo en semillas pretratadas con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. La aplicación de Benomil sin desinfección externa tuvo mayor germinación si se compara con el Captan ($p = 0,008$), a su vez el Captan fue significativamente menor en germinación que cuando no se les aplicó ningún tipo de desinfección externa o interna (control) ($p = 0,021$), mientras que el benomil tuvo mayor longitud de la raíz en comparación al control ($p = 0,0042$). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2-4.

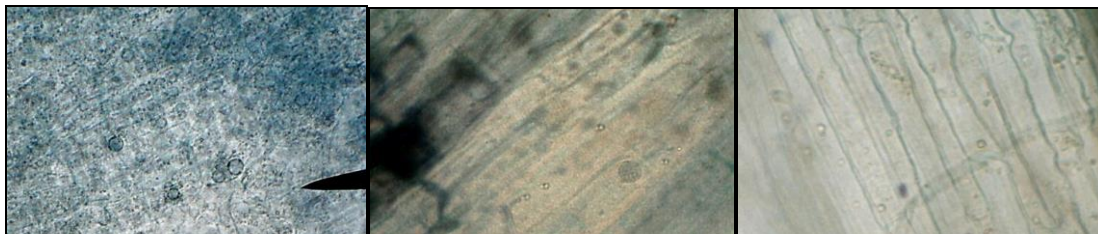
Figura 2-4. Germinación de semillas, longitud y colonización de endófitos en raíces en cada tratamiento. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES), (n=300)

Experimento	Germinación de semillas (%)	Longitud de raíces (cm)	Colonización de endófitos (Raíces con hongos/Nº raíces evaluadas)
I	$p = 0,036$ 	$p = 0,1639$ 	
II	No se obtuvo germinación al someter las semillas a calor	NA	NA
III	$p = 0,5808$ 	$p = 0,598$ 	
IV	$p = 0,0055$ 	$p = 0,0047$ 	

Tratamientos aplicados externos e internos

Con respecto a la actividad microbiana residual al interior de la semilla, en los dos primeros experimentos que presentaron germinación se observó colonización por hongos endófitos (Figura 2-4), evidenciada por la presencia abundante de esporas de hongos endófitos en las raíces a los cinco días de germinadas las semillas (Figura 2-5).

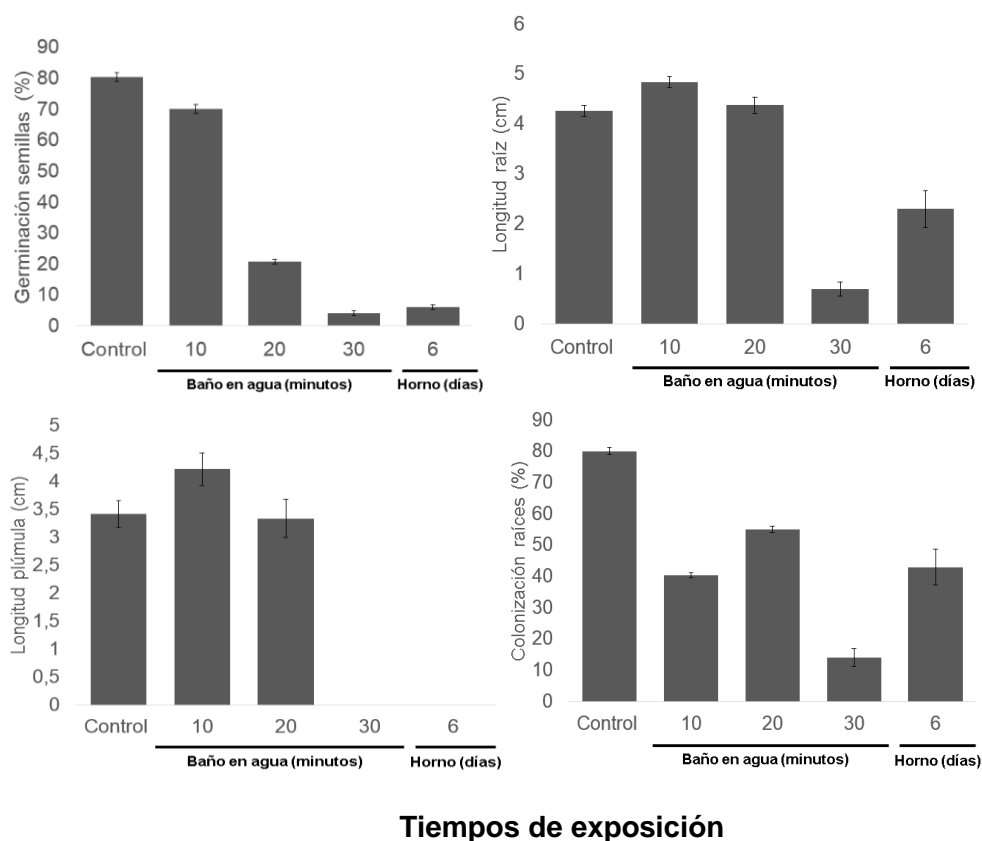
Figura 2-5. Presencia de esporas de hongos endófitos al interior de las raíces de *B. decumbens* cinco días después de aplicados los tratamientos de desinfección externa e interna a las semillas. Tinción según la metodología de Vierheilig et al., (1998).



Desinfección externa (NaOCl al 5%) e interna (calor a diferentes tiempos) de semillas

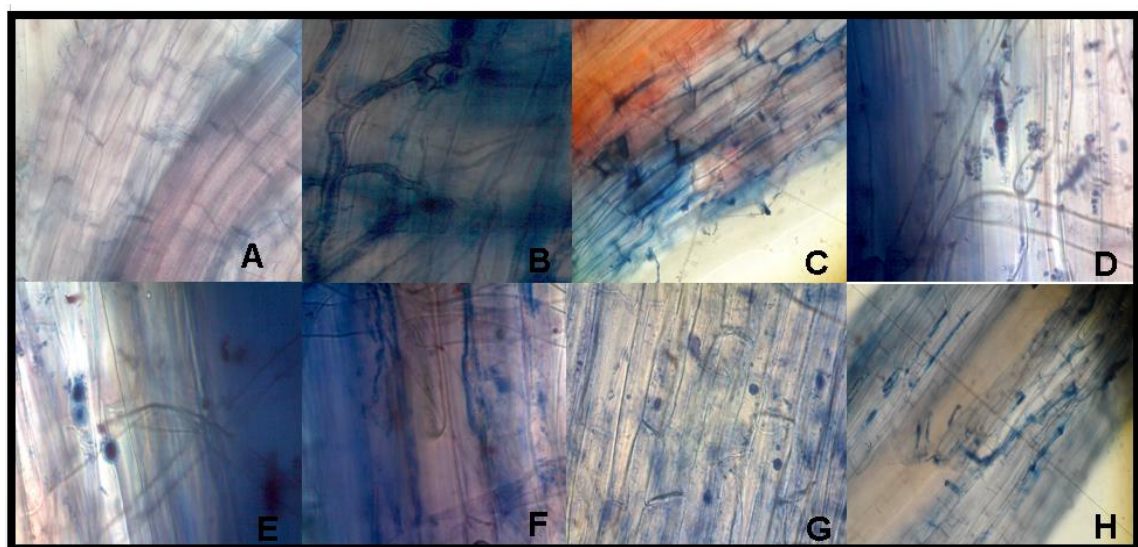
La utilización de calor como método de desinfección externa e interna de semillas no eliminó totalmente los hongos endófitos de la raíz, sin embargo se encontró que los tratamientos donde se sometieron las semillas a 60°C por 10 y 30 minutos redujeron significativamente alrededor del 40 ($p=0,047$) y 80 % respectivamente la colonización de estructuras fungicas en la raíz al compararse con las semillas que no se sometieron a calor, aunque este último tratamiento significativamente tuvo efecto negativo en la germinación de las semillas y la longitud tanto de la raíz ($p=0,006$) como de la plúmula ($p=0,022$) (Figura 2-6).

Figura 2-6. Desinfección de semillas de *B. decumbens* por calor en diferentes tiempos de exposición. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES), (n=50 por tratamiento)



La tinción dual permitió observar diferentes estructuras de los hongos endófitos en las raíces, se tiñeron de color azul estructuras con forma no definida, nombradas por Barrow (2003) como atípicas (Figura 2-7, B y F), formas definidas como hifas septadas oscuras (hifas melanizadas), (Figura 2-7, A), esporas y posibles cuerpos lipídicos de hongos que eran estructuras teñidas de color rojo con los bordes de color azul (Figura 2-7, C y D). En los tratamientos con calor en baño de agua había mayor presencia de estructuras atípicas, mientras que en el tratamiento con el horno se presentó un mayor número de esporas.

Figura 2-7. Diferentes estructuras formadas por hongos endófitos en la raíz de *B. decumbens*. A. Tejido sin estructuras fúngicas, B - E. Semillas sin exposición a calor, F. Semillas expuestas 60°C en baño de agua, G y H. Semillas expuestas 60°C en horno. Tinción metodología modificada de Barrow, (2003).



2.6 Discusión

El sistema de germinación en bolsas permitió evaluar en condiciones controladas y en menos de cinco días, la efectividad de tratamientos para erradicar o reducir hongos endófitos en plántulas de *B. decumbens*. Esto permitirá diseñar experimentos con controles experimentales apropiados al analizar el papel de estos hongos en plantas, y también evidencia su presencia innata en raíces y semillas del pasto *B. decumbens*, acompañada de las dificultades para erradicarlos completamente.

La presencia de esos endófitos en raíces de plantas propagadas por semillas, con la aparente imposibilidad para erradicarlos tiene implicaciones para la realización de pruebas de re-inoculación con estos microorganismos, ya que el pasto *B. decumbens* parece presentar una simbiosis obligada planta–endófito, similar a la descrita en otras especies. Por ejemplo, usando métodos y moléculas diferentes a los usados cerca de 90 años atrás por Rayner, (1929), este autor afirmaba no poder obtener plantas de *Vaccinium sp* libres de hongos, ya que estos penetran profundamente el endospermo de semillas y durante la germinación todos los tejidos que emergen son invadidos por el micelio de dichos hongos.

La imposibilidad de erradicarlos también fue presentada anteriormente para plantas micropropagadas de *Bouteloua eriopoda* (Barrow et al., 2004). A nivel experimental, si no se cuantifica el efecto de simbiontes innatos en material de propagación antes de inocular otros hongos, sería difícil concluir sobre el papel en el desempeño vegetal por inoculación de aislamientos particulares de hongos. Aunque la transmisión de hongos endófitos puede ser a través de semillas (vertical) o contacto entre plantas (horizontal) (Wiewióra et al., 2015), numerosas investigaciones no registran pruebas sobre la limpieza de plantas testigo. Sin embargo, esos resultados podrían depender de la presencia o ausencia de estos hongos.

De acuerdo con Gutiérrez et al (2006) la germinación de semillas de pastos así como la velocidad de crecimiento y desarrollo de plántulas, está determinada tanto por la condición genética y fisiológica del material, como por condiciones ambientales. Según estos resultados, esas condiciones ambientales para *B decumbens*, pueden ser representadas correctamente por las condiciones de esterilidad, humedad y alternancia de períodos de luz y oscuridad usados aquí, con un efecto mínimo de la temperatura, similar a lo presentado por ese mismo autor.

Con respecto a la desinfección externa del material vegetal, la aplicación de sales como NaOCl y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ no solo disminuyó la presencia de hongos y bacterias en la superficie de las semillas, sino que también favoreció la germinación y desarrollo de las plántulas al permitir germinaciones superiores al 70% y mayor número de raíces principales. Una posible causa para la no erradicación total de microorganismos superficiales puede deberse a que su efectividad es dependiente de la concentración inicial de microorganismos y a detección inadecuada de los mismos. Para Sauer & Burroughs (1986), la concentración de microorganismos es un factor limitante en la desinfección. Estos autores afirman que un alto número de esporas puede crear una barrera que impide la penetración del compuesto químico, y una alta concentración puede producir muerte incompleta de esporas como resultado de una pérdida de contacto entre las esporas y el desinfectante. Por otra parte, aunque la siembra en PDA para confirmar la desinfección superficial de las semillas es muy usada, algunas especies de microorganismos son indetectables a través de este medio, y sería preferible emplear también métodos adicionales como la serológica, moleculares, citométricas y la utilización de microscopía de fluorescencia (Gamalero et al., 2003).

En relación con la presencia innata de endófitos, se revisó exhaustivamente información sobre metodologías de esterilización de semillas o plántulas usadas en estudios con estos hongos, donde se garantizara la ausencia de hongos endófitos en los tratamientos control al final de los experimentos comparados con los tratamientos que involucran la inoculación de estos hongos. Utilizando las palabras claves fungal +septate +endophyte +plant +roots +anova, desde 2014 hasta 2015, sin incluir patentes, se obtuvieron 89 artículos de los cuales 17 cumplían con las características señaladas anteriormente, mientras que los otros se enfocaban en la identificación de estos hongos u otros aspectos. De los 17 artículos solamente siete mencionan explícitamente la presencia o no de hongos endófitos en las raíces de sus controles al final del experimento. Estos estudios incluye una planta modelo como la col china (Diene et al., 2014) y otros tipos de plantas como monocotiledóneas y dicotiledóneas. No se incluyen todas las referencias aunque puede ubicarse fácilmente utilizando el mismo criterio de búsqueda mencionado anteriormente.

De todas formas sería deseable usar otro tipo de pruebas que podrían ser de utilidad para determinar la presencia de endófitos, como la cuantificación de la actividad enzimática de los hongos endófitos sugerida por Kjøller & Rosendahl (2000). Para estos autores bajas concentraciones de Benomil ($1\mu\text{g g}^{-1}$ de suelo) pueden inhibir en

micorrizas la producción de fosfatasa alcalina responsable de la mineralización del fósforo orgánico en zonas de rizósfera, reduciendo por lo tanto la actividad metabólica del hongo e incluso su capacidad de colonizar raíces. Sin embargo, por el costo y complejidad, esta prueba sería aplicable en un número reducido de muestras y para estudios histológicos detallados en porciones específicas de las raíces, lo que hace necesario desarrollar nuevos métodos para análisis masivo de plantas y raíces a bajo costo, que garanticen la disponibilidad de un gran número de plantas libres de endófitos. Otros métodos de cuantificación de biomasa de hongos metabólicamente activos en raíces de plantas es la medición de ergosterol, quitina (Ekblad et al., 1998), succinato deshidrogenasa y técnicas moleculares como análisis de ADN

En cuanto al tratamiento térmico, la alta temperatura empleada (85°C por 10 min) inhibió la germinación de semillas de *B. decumbens*, por lo tanto, fue necesario evaluar temperaturas más bajas y en exposición a diferentes tiempos, encontrándose que aunque ningún tratamiento eliminó totalmente los endófitos, desinfectar las semillas externamente con NaOCl en combinación con calor (60°C, 10 min) redujo el porcentaje de colonización de hongos endófitos, alrededor de 40% sin ocasionar daños evidentes a la planta. En Wali & Saikkonen (2011) eliminaron endófitos de semillas del pasto *Festuca arundinacea* con exposiciones a calor por 50 minutos. Aunque la recomendación de tiempo por otros autores puede ser de meses (Kannadan & Rudgers, 2008; Li et al., 2012) en los pastos *Poa alsodes* y *Achnatherum sibiricum*, sin afectar la germinación.

Al analizar el efecto de los fungicidas en la desinfección interna de semillas, se observa que hubo un efecto significativo del Captan y del Benomil sobre la germinación y desarrollo de las semillas, no obstante se advierte que su acción como desinfectantes internos de semillas es ineficiente, ya que no lograron eliminar de las raíces estructuras de hongos tales como esporas, cinco días después de aplicados los tratamientos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cheplick et al., (2000); Bayman et al., (2002); Gamboa et al., (2005) y Cheplick, (2011) quienes empleando concentraciones más altas de Benomil o Captan (Barney, 2003), otras formas de aplicación del fungicida (al sustrato, sobre plántulas) e incluso otros fungicidas de acción traslaminar o de contacto como el propiconazol o el procloraz no lograron eliminar en un 100% los hongos endófitos en plántulas de *Lepanthes rupestris*, *Guarea guidonia* o *Lolium perenne*.

Como recomendación, el tratamiento de semillas con calor, combinado con aplicación de fungicidas permitiría obtener plantas con poblaciones reducidas o libres de endófitos. Sin embargo, los tiempos y dosis deberán determinarse para cada especie vegetal. Para el caso de los fungicidas, después de aplicados será necesario determinar el efecto residual del fungicida en las plántulas a través del tiempo cuando se desean inocular otros hongos, ya que algunos fungicidas permanecen hasta 20 días en la planta (Proost & Smit, 2013).

2.7 Conclusiones

Los resultados sugieren la presencia innata de hongos endófitos en las plantas de *B. decumbens* y la ineficacia de tratamientos químicos o físicos para erradicarlos. La investigación en este campo deberá partir de la asociación simbiótica ya presente en el material de propagación para determinar la importancia de esta simbiosis en la tolerancia de las plantas a los ambientes extremos comúnmente encontrados en condiciones naturales.

La identificación de los hongos no eliminados de la raíz, requeriría métodos o técnicas moleculares que están por fuera de los objetivos de esta investigación. Por un lado se necesita identificar una mezcla de hongos directamente en la raíz, que requiere el uso de cebadores muy amplios, que no garantizan la amplificación específica de todos los hongos de interés. Por ejemplo Yuan et al., (2010) presenta diferencias grandes entre lo que se aísla directamente (58 aislamientos diferentes) de una misma raíz y los que pueden detectarse por la técnica de PCR (apenas 31). Sin embargo, los registros aquí incluidos de esos hongos en las raíces de este pasto podrían ser los primeros presentados al menos en suelos de Colombia. Estudios posteriores deberán abordar el tema de identificación detallada de la diversidad de hongos endófitos, para los que al menos se conoce ahora una función posible en las plantas frente a ambientes adversos.

3. Efecto de hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia de *Brachiaria decumbens* a baja fertilidad del suelo o sequía.

3.1 Resumen

Se han realizado estudios sobre asociaciones entre hongos endófitos y pastos, pero aún no es claro si los endófitos septados oscuros (HESO) benefician a la planta en mejorar su tolerancia al estrés abiótico. Se evaluó la hipótesis que los HESO promueven la tolerancia a sequía y baja fertilidad general del suelo en pastos. En invernadero, plántulas de *Brachiaria decumbens* obtenidas de semillas con y sin reducción de HESO por calor, en un primer experimento se expusieron o no a sequía y en un segundo experimento se sembraron en dos tipos de suelo con variación extrema en fertilidad general del suelo (fertilidad alta y baja). En sequía, no se encontraron efectos claros de los hongos en la tolerancia del pasto a esta condición en las variables de crecimiento. Pero las plántulas con reducción de endófitos por calor mostraron significativamente mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno y síntomas de estrés en hojas, comparado con las plántulas sin reducción de endófitos por calor. En baja fertilidad del suelo, se encontraron efectos positivos de los hongos en la tolerancia del pasto a esta condición; las plántulas sin reducción de endófitos por calor mostraron significativamente mayor colonización por hongos endófitos, peso de la raíz y en la altura de las plántulas, también presentaron síntomas de deficiencia nutricional desde los 27 días de crecimiento, comparado con las plántulas con reducción de endófitos por calor. Las plántulas fueron afectadas negativamente por la sequía y la baja fertilidad del suelo en las variables de crecimiento y en el porcentaje de colonización con estructuras de los hongos endófitos septados oscuros en las raíces.

Palabras claves: Fertilidad del suelo, fosforo, nitrógeno, sequía, simbiosis

3.2 Abstract

Various studies had been conducted on the symbiosis between endophytic fungi and tropical grasses, but it is still unclear whether the dark septate endophytes (DSE) can improve plant tolerance to abiotic stress. We tested the hypothesis that DSE would promote pasture tolerance to drought and low soil fertility. In a greenhouse, *B. decumbens* seedlings from seeds naturally infected by DSE fungi, either with heat treatment for reducing these fungi or without this treatment, were exposed to extreme conditions of drought or low soil fertility (high and low fertility). Under drought, no effects of fungi on grass tolerance to this condition were found on growth variables. But seedling with endophytes reduced by heat showed significantly greater presence of reactive oxygen species and leaf stress symptoms, compared to seedling without reduction of endophytes by heat. In soil with low fertility, positive effects of fungi on grass tolerance to this condition were found; seedling without reduction of endophytes by heat showed significantly higher colonization by endophytes, root weight and height of the seedlings, they also presented deficiency symptoms of nutritional after 27 days of growth, compared to seedling with endophytes reduced by heat. Seedlings were negatively affected by drought and low fertility soil in the growth variables and in the percentage of colonization with dark septate endophyte fungi in the roots.

Key words: Soil fertility, dark septate endophytes, drought, simbiosis, nitrogen, phosphorous.

3.3 Introducción

En los últimos años se han presentado en el país condiciones y variaciones ambientales extremas, como el fenómeno del Niño y la Niña. El aumento de más de 2°C comparada con la temperatura actual reduciría la disponibilidad de agua afectando la productividad agrícola (Fernández, 2013). De acuerdo a la Encuesta Nacional Agropecuaria de 2013, Colombia destina el 80,3% del suelo a la actividad pecuaria y el 68% de estas a pastos, siendo Meta, Casanare y Antioquia los departamentos con mayor extensión de pastos. Muchos de estos suelos son ácidos del tipo Oxisoles y Ultisoles que se caracterizan por la deficiencia de nutrientes y toxicidad por alta concentración de Al (Amézquita et al., 2013).

La precipitación y la baja fertilidad son factores críticos para el desarrollo de la ganadería en estas zonas, ya que se disminuye severamente la producción de pasto afectando su calidad nutricional con consecuencias negativas en el peso vivo del ganado y la producción de leche (Bernal & Espinosa, 2003; Cuadrado et al., 2003). Se han desarrollado diferentes estrategias para evitar la escases de pastos, muchas de estas prácticas pueden llegar a ser costosas como el uso de riego, henificación y ensilaje, (Faria, 2006), aplicación de fertilizantes de N y P, asociaciones con leguminosas para obtener N (Boddey et al., 1998), por lo que el uso de variedades de pastos que se adapten a estas condiciones parece ser la mejor opción.

Brachiaria decumbens es una de las especies de pastos más cultivados en Colombia en el trópico bajo (Rincón, 1999) por ser tolerante a la sequía (Rao et al., 1998) y a suelos ácidos, tiene buena calidad nutricional y buen consumo por el ganado bovino (Keller-Grein et al., 1998). Entre los mecanismos de adaptación a la sequía sin considerar la simbiosis con microorganismos, está el plegamiento de las hojas (Guenni et al., 2004), cierre estomacal temprano por la rápida reducción del contenido relativo de agua (CRA) en hojas, alta densidad radical y disminución de la biomasa aérea (Guenni et al., 2006). Entre las estrategias de la planta frente al bajo suministro de nutrientes como el P en el suelo, están los cambios morfológicos en el diámetro, el volumen y la longitud de la raíz, mayor biomasa aérea (Mejía et al., 2009). En pastos con deficiencia de P, las hojas viejas adquieren una coloración púrpura que se pueden extender a las jóvenes, mientras que la deficiencia de N hay aparición de clorosis en hojas, la deficiencia de ambos elementos disminuyen el crecimiento de la planta (Ayarza, 1991).

Es conocido que las plantas forman asociaciones con hongos micorrícicos y/o hongos endófitos que pueden beneficiar su crecimiento y mejorar su resistencia al estrés biótico y abiótico (Rodríguez et al., 2004). La asociación simbiótica de las plantas con las micorrizas le permite a la planta obtener P de suelos con baja disponibilidad de este nutriente, y el hongo puede recibir carbohidratos de la planta. (Willmann et al., 2013). Otro beneficio es que las plantas se adaptan a condiciones de sequía gracias a la asociación con micorrizas (Jeliazkova & Percival 2003). Postma, (2007) y colaboradores, dicen que en suelos con pH bajo las micorrizas pueden ser remplazados por hongos endófitos septados oscuros que normalmente están presentes en esta condición.

Los hongos endófitos con las plantas pueden tener una relación mutualista, neutral o antagonista dependiendo de las condiciones ambientales (Sieber & Grünig 2006), sin embargo son diversos los hongos que han mostrado conferir tolerancia a las plantas en condiciones de sequía, entre estos *Piriformospora indica* (Sherameti et al., 2008), *Fusarium spp*, *Curvularia spp* y *Colletotrichum magna*, con buenas capacidades de colonización (Rodríguez et al., 2008) al igual que *Neotyphodium coenophialum* en suelos con bajos nutrientes (Rahman & Saiga, 2007).

Los hongos endófitos septados oscuros (HESO) generalmente pertenecen al filo Ascomycota, pueden ser conidiales o estériles, forman estructuras como hifas y microesclerocios melanizados inter e intracelularmente en la raíz, sin causar aparente efecto negativo sobre la planta huésped (Rodríguez et al., 2009). Se han asociado a diferentes tipos de plantas en el mundo, y están presentes en diversos ambientes extremos (Jumpponen & Trappe, 1998). Tienen grandes capacidades enzimáticas, sugiriendo potencial para acceder a detritos de C, N y P (Mandyam & Jumpponen, 2005), así que este grupo de hongos le facilitaría a la planta la toma de nutrientes del suelo. Se ha encontrado que estos hongos ofrecen beneficios en la absorción ya sea de N o P cuando hay más disponibilidad o cuando los niveles de uno de los dos elementos en el suelo son adecuados (Jumpponen, et al., 1998).

Por encontrarse estos hongos en plantas en sitios extremos, se considera que cumplen una función importante en la tolerancia o resistencia de la planta a estos ambientes, como ocurriría en suelos secos o con fertilidad baja. Sin embargo este grupo de hongos ha sido poco estudiado, especialmente su papel en la tolerancia de plantas tropicales a condiciones extremas de sequía. No obstante, para realizar estudios con estos hongos basados en inoculación de suelo o material vegetal, la mayor dificultad es que los HESO son transmitidos verticalmente a través de las

semillas (Barrow, 2003). Por consiguiente es difícil planear experimentos controlados con plantas que no están libres de hongos, así que su estudio debe partir de la asociación simbiótica ya presente en la planta y heredada de la semilla o material de propagación vegetal.

Con base en los métodos evaluados en el capítulo anterior para la reducción de la colonización natural de estos hongos, en este estudio se evaluó el efecto de los hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia de plántulas de *B. decumbens*, sometidas a las condiciones extremas de sequía o baja fertilidad general del suelo, se implementaron los siguientes procedimientos:

3.4 Materiales y métodos

Tratamiento y germinación de semillas de *B. decumbens*

Para obtener plántulas con niveles variables de colonización, se utilizaron aproximadamente 200 semillas comerciales (Agrosemillas, lote:R044/12, pureza 95,1%) que fueron pretratadas superficialmente con NaOCl al 5% p/v por 3 min, se descartaron las semillas que flotaban, las restantes se lavaron en agua destilada estéril (Simons et al., 1996), estas se dividieron en dos casetes estériles, uno de estos se sumergió en agua destilada estéril a 60°C por 10 min, luego el casete se sumergió en agua destilada estéril a 4°C por 4 min (Reducción de la colonización natural de hongos endófitos en semillas). El otro casete se sumergió en agua destilada estéril a temperatura ambiente por 10 min, luego el casete se sumergió en agua destilada estéril a 4°C por 4 min (Sin reducción de la colonización natural de hongos endófitos en semillas).

Las semillas provenientes del tratamiento con calor y sin calor se pusieron en cajas de Petri con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por cuatro días hasta que las raíces alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud.

Desempeño de las plántulas de *B. decumbens* en dos condiciones de estrés abiótico

Consistió en dos experimentos independientes en invernadero. Ambos utilizaron plántulas de *B. decumbens* obtenidas de semillas con o sin reducción de HESO por desinfección o no por calor. En el primer experimento se expusieron o no a sequía. En el segundo experimento se sembraron en dos tipos de suelo con variación extrema en fertilidad general del suelo (fertilidad alta y baja).

Los experimentos se llevaron a cabo en el invernadero, ubicado en la Universidad Nacional de Colombia - sede Medellín. Los suelos se esterilizaron en autoclave dos veces, cada una a 121°C y 15 lb por 20 min.

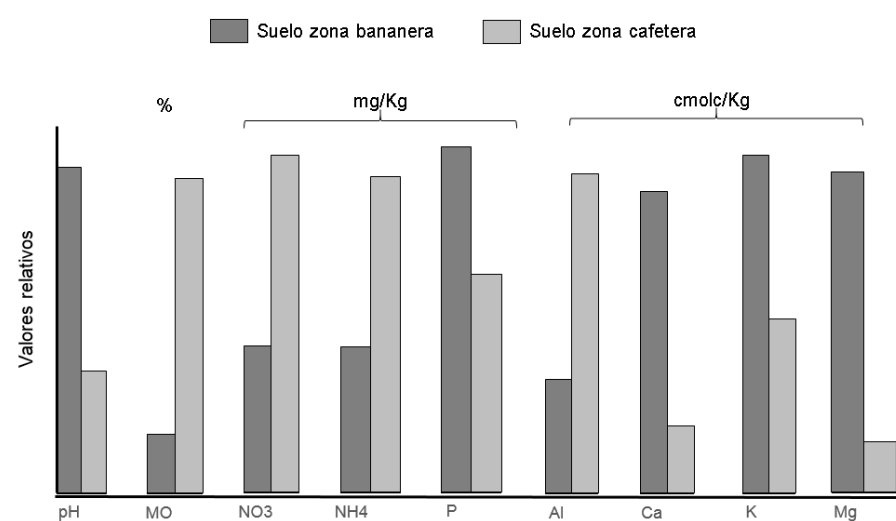
Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* expuestas a sequía

Se utilizó suelo proveniente de la zona bananera de la región del Urabá- Antioquia, se caracterizó con un pH de 5,2, concentración de M.O (1,6%), P (19 mg/kg), N-NO₃ (10 mg/kg), N-NH₄ (18 mg/kg), K (0,64 cmolc/kg), Ca (11,6 cmolc/kg), Al (0,5 cmolc/kg) y Mg (5,3 cmolc/kg). 40 semillas germinadas que se trataron y 40 no tratadas con calor se plantaron individualmente en vasos de plástico de 7 oz, llenados cada uno con 150 gr del suelo estéril. Las plántulas se ubicaron en el invernadero y se distribuyeron completamente al azar. Las plántulas inicialmente se regaron con 60 mL de agua estéril, luego diariamente dos veces al día se regaron con 10 mL de agua estéril para mantener el suelo a capacidad de campo. A 20 plántulas provenientes de semillas que se sometieron a calor y 20 plántulas de semillas que no se sometieron a calor se les suspendió el riego a los 25 días de plantadas, durante ocho días. Las demás plantas se regaron normalmente hasta terminar el experimento.

Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* en dos suelos con fertilidad variable.

Se utilizaron dos tipos de suelo con variación extrema de fertilidad general, uno de ellos era una mezcla de muestras de suelo proveniente de la zona bananera de la región del Urabá - Antioquia, y se consideró como de fertilidad alta, por presentar mayor pH y alto contenido de bases intercambiables. El otro era de una mezcla de muestras de suelo de la zona cafetera de Antioquia, que se consideró como de fertilidad baja por presentar menor valor de pH y de bases intercambiables (Figura 3-1). La cantidad de suelo, siembra de semillas y volumen de agua de riego se realizaron igual que en el experimento precedente, excepto que todas las plántulas tuvieron riego hasta el final del experimento.

Figura 3-1. Valores relativos de los componentes químicos de dos tipos de suelo con fertilidad variable



VARIABLES RESPUESTAS

Para los dos experimentos todas las plántulas se cosecharon a los 33 días de plantadas. Se estimó el peso seco de las plántulas a partir de dos ecuaciones de regresión obtenidas con datos de peso fresco y peso seco, para hojas ($y = 0,192x - 0,180$, $R^2 = 0,845$) y para la raíz ($y = 0,124x + 2,493$, $R^2 = 0,875$). Estas fueron halladas antes de los experimentos a partir de 30 plántulas de *B. decumbens* crecidas durante 20 días en el laboratorio de Microbiología de Suelos, se sembraron en suelo proveniente de la zona bananera de la región del Urabá – Antioquia, el crecimiento se realizó con fotoperiodos 12 horas oscuridad y 12 horas luz natural y se les agregó agua destilada hasta el día de la cosecha. Las hojas, tallos y raíces se secaron en un horno a 60°C por tres días. Esto se realizó debido a que se necesitaban las hojas y las raíces frescas de las plántulas de los experimentos para la medición de las variables respuesta Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), Contenido relativo de agua en hojas (CRA) y colonización de la raíz. A partir del peso seco se obtuvo la relación de la biomasa de la parte aérea/radicular.

Para ambos experimentos se obtuvieron las siguientes variables

- Número y diámetro de raíces adventicias. Determinadas en imágenes analizadas en el software libre Image J (Rasband 2007).
- Porcentaje de Colonización. Se realizó el método modificado de tinción dual de raíces presentado por Barrow (2003), pero sin incluir los pasos iniciales de aclareo y blanqueamiento de las raíces, debido a que estas eran bastante jóvenes. También se modificó la preparación de los colorantes, ya que estos se precipitaban. El Azul de Tripano (AT), se preparó de acuerdo al fabricante (Sigma-Aldrich) (0.4 gr AT, 0.81 gr NaCl, 0.06 gr KH_2PO_4 en 100 mL de H_2O) y el Sudan IV (0.2 gr sudan IV en 50 mL EtOH 70% y 50 mL $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$). El porcentaje de colonización se determinó usando el método de las intersecciones de Giovanetti & Mosse (1980), siendo positivos la presencia de estructuras del hongo como hifas, esporas, cuerpos lipídicos y estructuras atípicas mencionadas por Barrow (2003) como protoplastos, sin pared distinguible o con paredes muy delgadas hialinas y de difícil detección por tinciones para quitina fúngica; siendo negativos la no presencia de las estructuras del hongo. Esto se realizó usando microscopio OlympusBmax (magnitud 40X) y se tomaron fotos con la cámara digital Celestron modelo 44421, (aumento 15X).

% Colonización= [Conteos positivos / (Conteos positivos + Conteos negativos)] x100

Para el experimento del efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* expuestas a sequía, se determinaron:

- Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Se cortaron cuatro fragmentos de 3 x 3 mm de la cuarta o quinta hoja de cada plántula, fueron colocados en solución de 1µM del herbicida y se incubaron a temperatura ambiente bajo luz fluorescente por 24-48 horas. La oxidación de la clorofila se visualizó por el blanqueamiento de los fragmentos. El resultado se reportó como la relación de número de fragmentos totales que tuvieron blanqueamiento por tratamiento/número de fragmentos totales utilizados por tratamiento (Rodríguez et al., 2008)
- Contenido relativo de agua en hojas (CRA). Se utilizó la tercera o cuarta hoja completamente expandida de cada una de las plántulas. Inmediatamente después

de cortada la hoja se pesó, así se determinó el peso fresco de la hoja (Pf), luego la hoja se remojó en agua destilada por 4 h en un lugar iluminado, después la hoja se secó con papel absorbente superficialmente sin presionar y se pesó para la determinación peso húmedo o turgencia en la hoja (Pt), por último la hoja se secó en horno a 60°C por tres días, así se determinó el peso seco de la hoja (Ps). (Kannadan & Rudgers, 2008)

Contenido relativo de agua en hojas= $[(Pf-Ps) / (Pt-Ps)] \times 100$

- Síntomas de estrés por sequía. Se realizó un seguimiento de síntomas antes y después de sequía. Se utilizó la escala de Redman et al., (2011) modificada, donde se evaluó el nivel de clorosis, marchitez y muerte de hojas en cada plántula. Se valoró de 1 a 5 (1= muerta, 2= marchitas y cloróticas, 3= marchitez leve y enrolladas, 4=enrolladas, 5= sanas, sin lesiones o marchitas).

Para el experimento del efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* en dos suelos con fertilidad variable, se determinaron:

- Altura de la planta: Se realizó midiendo con una regla desde la superficie del suelo hasta el ápice de la hoja más larga en cada una de las plántulas
- Síntomas generales de deficiencias como clorosis, descoloración, marchitez y muerte.

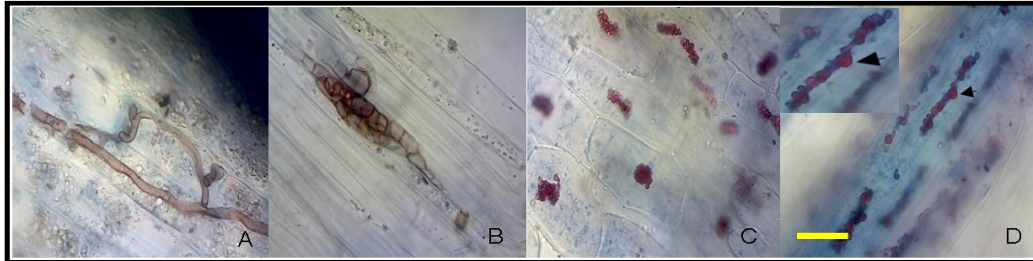
Análisis estadístico

En ambos experimentos se utilizó un diseño completamente al azar, con 20 réplicas para cada tratamiento y se evaluaron características fisiológicas, microbiológicas y bioquímicas del pasto. Cada replica estuvo constituida por una plántula sembrada en un vaso plástico. Se evaluaron los supuestos de normalidad de residuales y homogeneidad de varianzas para todas las variables, y las que no cumplieron los supuestos se transformaron (raíz cuadrada o logaritmo) los datos. En cada uno de los experimentos se realizó un ANAVA con arreglo factorial de tratamientos. El experimento uno evaluó los factores reducción o no de hongos por calor y exposición o no de las plántulas a sequía. El experimento dos evaluó los factores reducción o no de hongos por calor y fertilidad alta o baja del suelo. Se estimaron los efectos simples o sus interacciones. Se hizo comparación de medias con la prueba de Tukey. Para las variables que no cumplieron con los supuestos estadísticos se realizó análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal Wallis y comparación de medianas con la prueba de Dunn. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico libre R versión 3.2.0.

3.5 Resultados

En ambos experimentos se observaron diferentes estructuras de los hongos endófitos en raíces de plántulas con o sin reducción de hongos por la aplicación de calor a las semillas. Estas incluyeron hifas septadas hialinas o melanizadas (Figura 3-2, A), esporas y posibles estructuras conteniendo lípidos de hongos que se tiñeron de color rojo (tinción de lípidos con sudan IV) y con borde color azul (indicio de presencia de quitina por reacción con azul de tripano) (Figura 3-2, C y D). También estructuras con forma no definida nombradas por Barrow (2003) como atípicas que estaban unidas o no a cuerpos lipídicos (Figura 3-2, D).

Figura 3-2: Estructuras formadas por hongos endófitos septados oscuros en las raíces de *B. decumbens*. A Hifas septadas oscuras, B. microesclerosios, C cuerpos lipídicos envueltos en estructuras quitinosas (tinción con azul de tripano), D. estructuras atípicas unidas a cuerpos lipídicos (señalados por la flecha). Barra: 45 μm .



Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* expuestas a sequía

Tanto la reducción de hongos endófitos por la aplicación de calor como la exposición a sequía afectaron en forma significativa el peso seco de la raíz y la relación peso seco aéreo/raíz de las plántulas, así como la presencia de hifas y esporas en la raíz. Adicionalmente se encontró efecto significativo de la interacción entre reducción de endófitos por calor y sequía en el peso seco de la raíz y en la presencia de hifas y esporas en la raíz. (Tabla 3-1).

Cuando no se expusieron a sequía, las raíces de plántulas con reducción de endófitos por calor presentaron casi el doble de colonización de hifas y esporas, comparado con raíces de plántulas sin reducción de endófitos por calor. Cuando se expusieron a sequía, esa diferencia entre la reducción y no de hongos en las raíces, fue menor aunque significativa. (Figura 3-3 A)

En ausencia de sequía, las raíces de plántulas sin reducción de hongos por calor mostraron mayor colonización por estructuras atípicas y cuerpos lipídicos de hongos endófitos, al compararse con las raíces de plántulas con reducción de hongos por calor. Pero en sequía, las raíces de plántulas con reducción de hongos presentaron niveles iguales de colonización por estas estructuras respecto a las raíces de plántulas sin reducción de hongos. La presencia de cuerpos lipídicos fue mayor en plántulas expuestas a sequía al compararse con plántulas no expuestas a sequía (Figura 3-4 A y B).

Cuando no se expusieron a sequía, las raíces de plántulas sin reducción de endófitos por calor mostraron mayor peso seco en la raíz y menor la relación peso seco aéreo/raíz, comparado con las plántulas con reducción de endófitos por calor. Pero en presencia de sequía, las plántulas con reducción de hongos presentaron niveles iguales en el peso de la raíz y en la relación peso seco aéreo/raíz, respecto a las plántulas sin reducción de hongos. Tanto el peso seco de la raíz como el aéreo fueron casi dos veces menores en plántulas expuestas a sequía al compararse con las plántulas no expuestas a sequía. (Figura 3-5 A y B; Figura 3-6 A)

En la medición de variables en hojas del pasto se encontró: el contenido relativo de agua en hojas fue casi tres veces mayor en plántulas no expuestas a sequía, respecto a las plántulas expuestas a sequía. Pero en las plántulas expuestas o no a

sequía, no se presentaron diferencias entre la reducción o no por calor de los hongos endófitos (Figura 3-8). Además raíces de plántulas sin reducción de hongos endófitos y expuestas a sequía tuvieron menor cantidad de especies reactivas de oxígeno producidas que el resto de los tratamientos, con 31 de 80 fragmentos de hojas fotoblanqueadas (oxidación de la clorofila) durante 48h de exposición a Paraquat™.

Cuando se expusieron a sequía, las raíces de plántulas sin reducción de endófitos por calor mostraron menor número de raíces adventicias, comparado con las raíces de plántulas con reducción de endófitos por calor. Pero en no exposición a sequía, la reducción o no por calor de hongos de las raíces de las plántulas presentaron niveles iguales en el número de raíces adventicias. El diámetro de raíces adventicias fue mayor en plántulas no expuestas a sequía, respecto a las plántulas expuestas a sequía (Figura 3-9 A y B).

La presencia de síntomas de sequía en el pasto se observó dos días después de suspender el riego. Con reducción de hongos endófitos, de 20 plántulas expuestas a sequía 19 mostraron síntomas de estrés, inicialmente visible por el enrollamiento de las hojas. A los cuatro días, 11 de 20 plántulas tuvieron mayor número de hojas marchitas al compararse con las plántulas sin reducción de hongos. A los seis días de suspensión del riego, 14 de 20 plántulas con reducción de hongos y expuestas a sequía mostraron mayor clorosis y muerte de hojas con respecto a plántulas sin reducción de endófitos. En el día de la cosecha, tres de 40 plántulas no expuestas a sequía presentaron clorosis en las hojas.

Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* en dos suelos con fertilidad variable.

Tanto la reducción de hongos endófitos por la aplicación de calor como la fertilidad del suelo afectaron en forma significativa el peso seco de la raíz y la altura de las plántulas como la presencia de estructuras atípicas de hongos endófitos. Adicionalmente se encontró efecto significativo de la interacción entre reducción de endófitos y fertilidad del suelo en la altura de la plántula y en la presencia de estructuras atípicas de hongos endófitos (Tabla 3-1).

Cuando se sembraron en suelo con fertilidad alta las raíces de plántulas sin reducción de hongos endófitos por calor presentaron mayor colonización por estructuras atípicas de hongos endófitos, comparadas con las raíces de plántulas con reducción de hongos endófitos por calor. En el suelo con fertilidad baja esa diferencia entre la reducción y no de hongos en las raíces, fue menor aunque significativa (Figura 3-3 B).

En la siembra en suelo con fertilidad alta, las raíces de plántulas sin reducción de hongos endófitos por calor mostraron mayor presencia de cuerpos lipídicos de hongos y menor colonización por hifas y esporas, al compararse con las raíces de plántulas con reducción de hongos por calor. Pero al sembrarse en suelo con fertilidad baja, las raíces de plántulas con o sin reducción de hongos endófitos por calor no mostraron diferencias en la colonización por hifas y esporas. Sin embargo, fue menor la colonización por hifas y esporas y no se presentaron cuerpos lipídicos de hongos endófitos al compararse con raíces de plántulas sembradas en suelo con fertilidad alta. (Figura 3-4 C y D).

Cuando se sembraron en suelo con fertilidad alta, las raíces de plántulas sin reducción de hongos endófitos por calor presentaron mayor peso seco de la raíz al ser comparadas con las raíces de plántulas con reducción de hongos endófitos por calor. En el peso seco aéreo, no se encontró diferencias entre la reducción o no por calor de hongos endófitos de las raíces. Pero en el suelo con fertilidad baja, la diferencia entre la reducción o no de los hongos por calor en el peso seco de la raíz fue menor. El peso seco aéreo fue mayor en las plántulas sin reducción de hongos endófitos, al compararse con plántulas con reducción de hongos endófitos por calor. Además tanto el peso seco aéreo como la relación peso seco aéreo/raíz del pasto fueron menores al compararse con las plántulas sembradas en suelo con fertilidad alta. (Figura 3-5 C; Figura 3-6 B y C).

Cuando se sembraron en suelo con fertilidad baja, las plántulas con reducción de hongos endófitos por calor mostraron menor altura, respecto a las plántulas sin reducción de hongos endófitos por calor. Además la altura fue menor al compararse con las plántulas sembradas en suelo con fertilidad alta. Pero en suelo con fertilidad alta, las plántulas con o sin reducción de hongos endófitos por calor no mostraron diferencias en la altura. (Figura 3-7)

Para el número y diámetro de raíces adventicias, estas fueron mayores en plántulas sembradas en suelo con fertilidad alta respecto a las plántulas sembradas en suelo con fertilidad baja. Pero la reducción o no de hongos endófitos no tuvieron efecto en estas variables (Figura 3-9 C y D).

En suelo con fertilidad alta, las raíces de plántulas con reducción o no de hongos endófitos, mostraron síntomas generales de deficiencia de nutrientes a los 27 días de crecimiento, con clorosis en el ápice, en un cuarto de las plántulas. Al día de la cosecha cuatro de 40 plántulas presentaron muerte de hojas, respecto a 26 de 40 plántulas sembradas en suelo con fertilidad baja. En suelo con fertilidad baja, las raíces de plántulas con reducción de endófitos por calor, presentaron síntomas generales de deficiencia de nutrientes desde los 15 días de crecimiento, con 16 de 20 plántulas con manchas cafés en varias partes de la hoja. A los 27 días de crecimiento 18 de 20 plántulas, el ápice se tornó clorótico. El día de la cosecha presentaron muerte de hojas en 18 de 20 plántulas. Todo lo anterior comparado con raíces de plántulas con no reducción de endófitos. (Tabla 3-2).

Tabla 3-1: Resultados estadísticos del ANAVA, examinando efectos principales de condiciones de sequía o fertilidad variable sobre plántulas de *B. decumbens* infectadas con hongos endófitos septados oscuros. Valores $p < 0.05$ aparecen en negrilla.

Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* expuestas a sequía

Efecto	Hifas y esporas (%)		Peso seco raíz (mg)		Relación peso seco aéreo/ raíz	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Reducción endófitos por calor	54,5	1,7x10⁻¹⁰	39,7	1,8x10⁻⁰⁸	28,9	8,1x10⁻⁰⁷
Sequía	24,8	3,9x10⁻⁰⁶	323,2	2x10⁻¹⁶	14,4	0,0003
Reducción endófitos por calor x Sequía	10,9	0,00145	16,7	1,1x10⁻⁴	3,7	0,059

Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* en dos suelos con fertilidad variable.

Efecto	Estructuras atípicas (%)		Altura (cm)		Peso seco raíz (mg)	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Reducción endófitos por calor	96,9	4x10⁻¹⁵	5,16	3x10⁻⁰²	73,4	1x10⁻¹²
Fertilidad	972	2x10⁻¹⁶	312	2x10⁻¹⁶	1277	2x10⁻¹⁶
Reducción endófitos por calor x Fertilidad	4,78	0,032	4,4	3x10⁻⁰²	2,5	0,12

Figura 3-3: Formación de diferentes estructuras de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de plántulas de *B. decumbens* sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=20 en cada tratamiento). Residuales de variables con distribución normal.

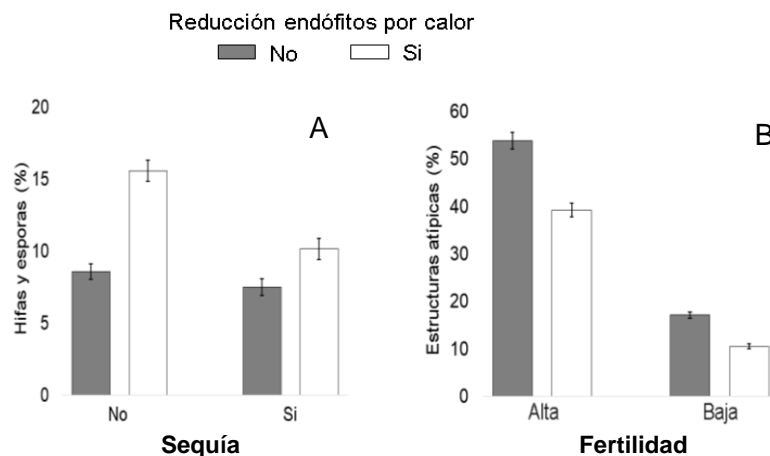


Figura 3-4: Formación de diferentes estructuras de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de plántulas de *B. decumbens* sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. (n=20 en cada tratamiento). Residuales de variables que no cumplen supuestos de normalidad. Línea horizontal azul muestra la media general de los tratamientos

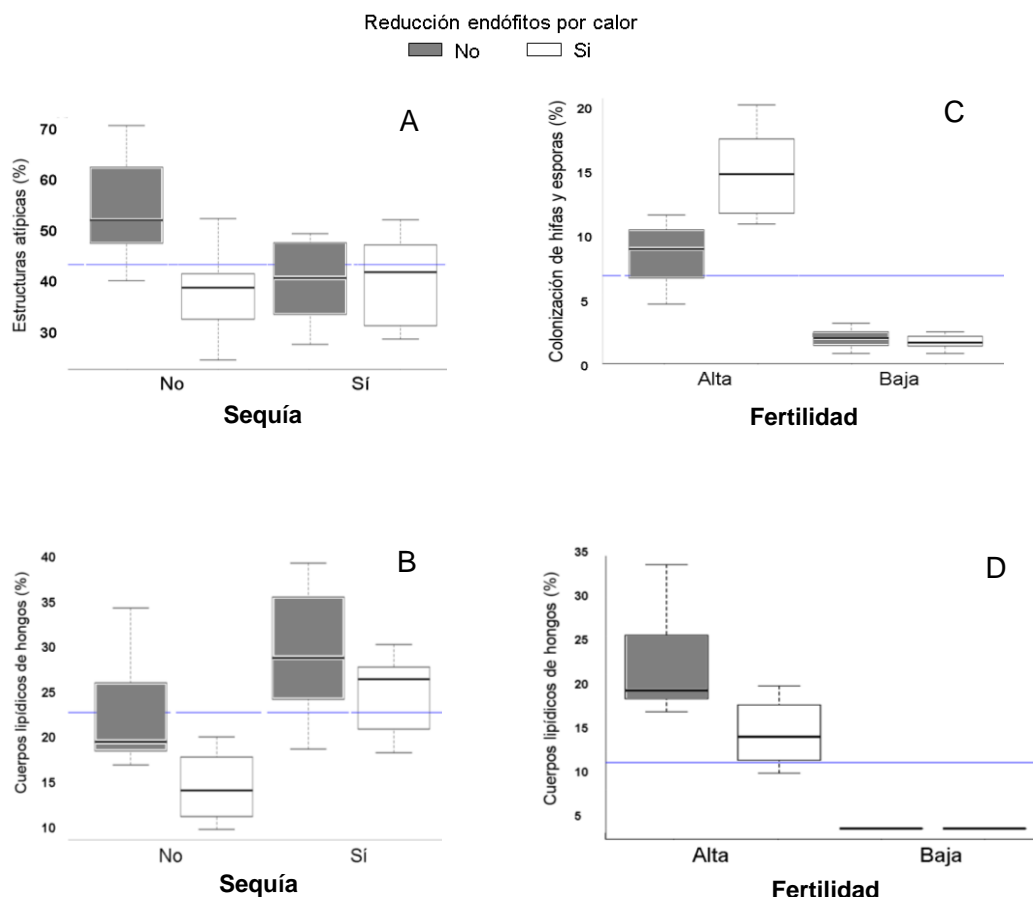


Figura 3-5: Biomasa de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=20 en cada tratamiento). Residuales de variables con distribución normal

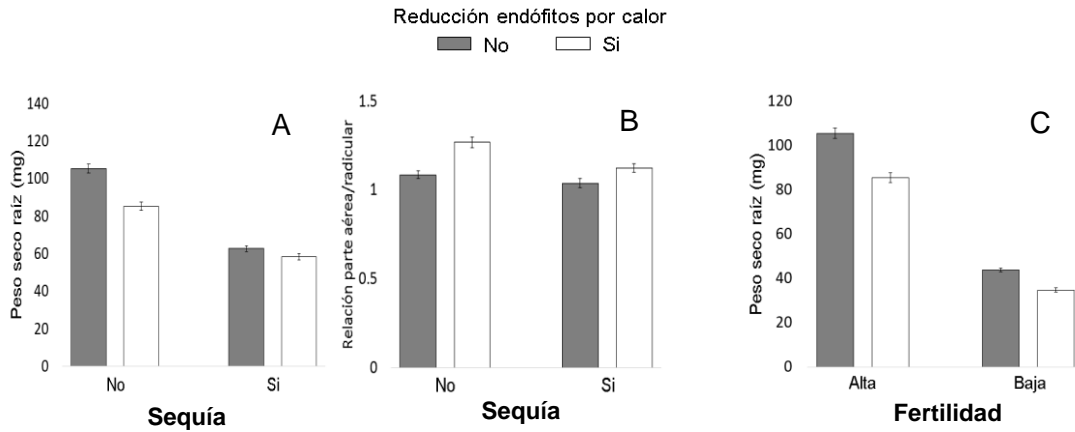


Figura 3-6: Biomasa de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. (n=20 en cada tratamiento). Residuales de variables que no cumplen supuestos de normalidad. Línea horizontal azul muestra la media general de los tratamientos

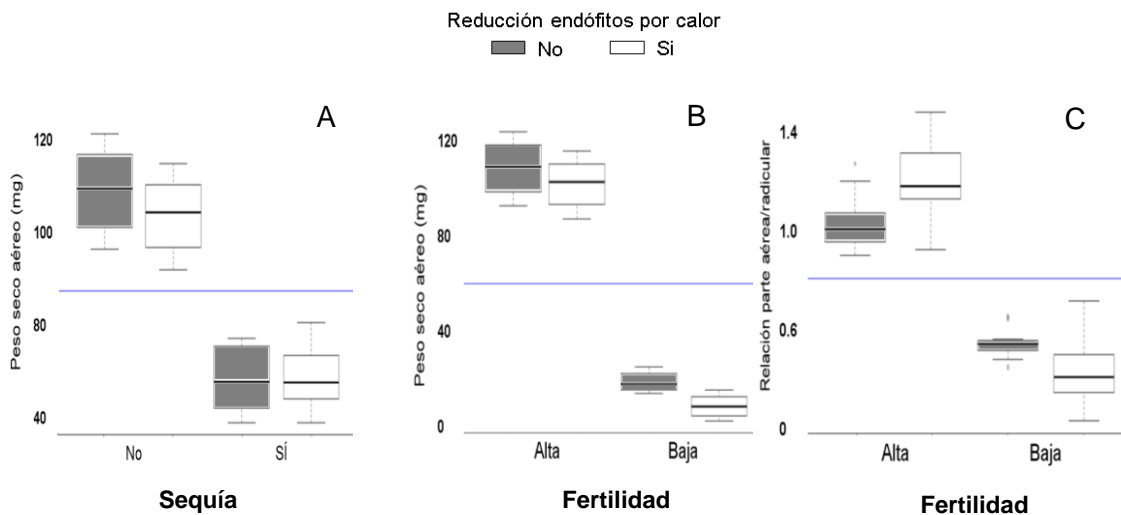


Figura 3-7: Altura de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a fertilidad variable. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=20 en cada tratamiento).

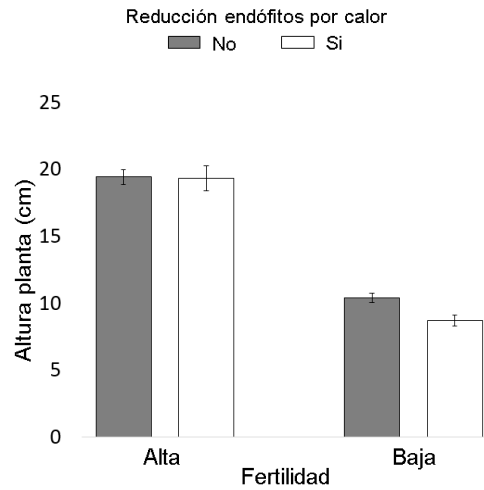


Figura 3-8: Contenido relativo de agua en hojas de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a sequía, (n=20 en cada tratamiento). Línea horizontal azul muestra la media general de los tratamientos

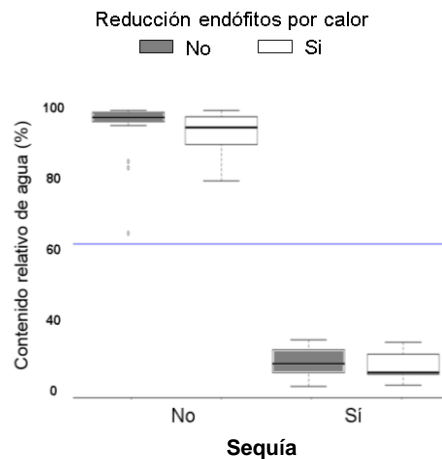


Figura 3-9: Número y diámetro de raíces adventicias de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a condiciones de sequía o fertilidad variable. (n=20 en cada tratamiento). Línea horizontal azul muestra la media general de los tratamientos

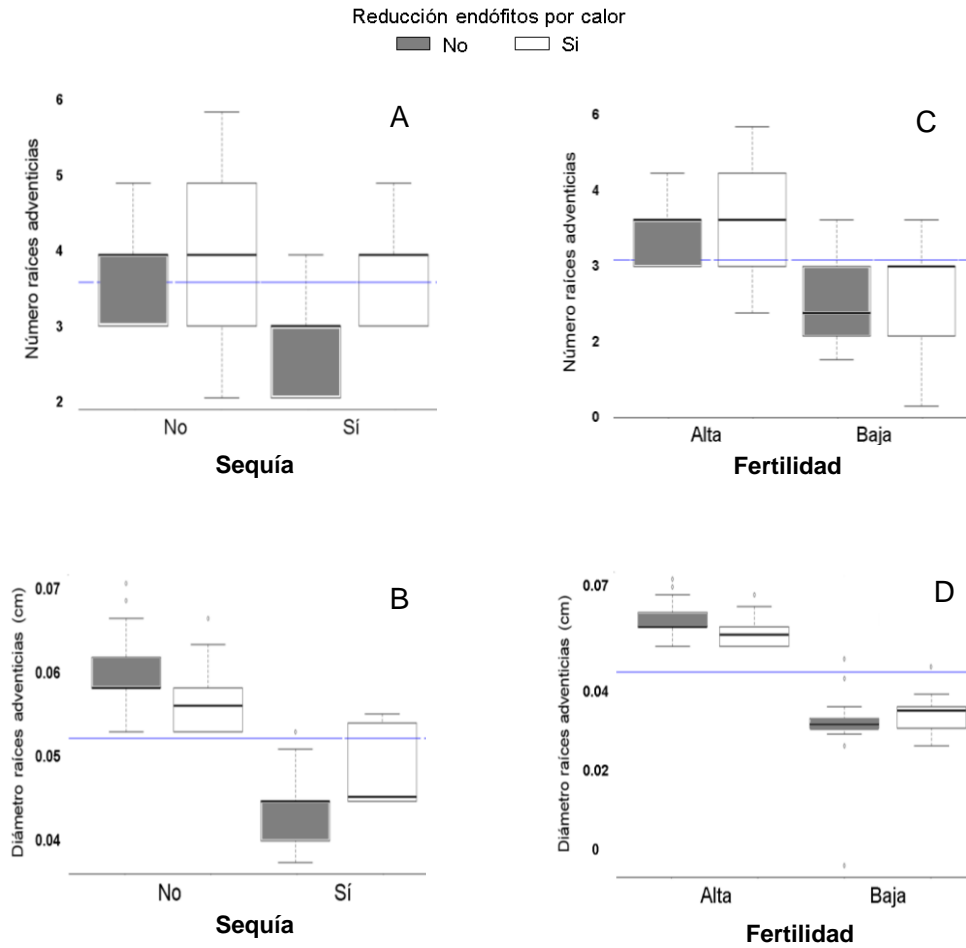


Tabla 3-2: Síntomas de deficiencia nutricional en hojas de plántulas de *B. decumbens* con hongos endófitos septados oscuros y sometidas a fertilidad variable (n=20 en cada tratamiento).

Tratamientos		Proporción de plántulas con síntomas de deficiencia nutricional en hojas (En diferentes días después de germinación (DDG) de las plántulas)		
		Características en hojas		Hojas muertas
Fertilidad	Reducción endófitos por calor	15 días DDG	27 DDG	33 DDG
Alta	No	0/20	4/20 Clorosis en ápice	2/20
Alta	Si	0/20	6/20 Clorosis en ápice	2/20
Baja	No	0/20	14/20 Manchas cafés. ápice amarilloso e inicio de muerte	8/20
Baja	Si	16/20 Manchas cafés	18/20 Manchas cafés. ápice amarilloso e inicio de muerte	18/20

3.6 Discusión

La exposición del pasto a las condiciones extremas de sequía y baja fertilidad general del suelo afectaron de manera negativa tanto la simbiosis como el desempeño de las plantas, como se evidencia principalmente del porcentaje de colonización de estructuras de los hongos endófitos septados en las raíces. Adicionalmente, el efecto de los hongos en la tolerancia del pasto a estas condiciones se presentó más en variables medidas en hojas que en la raíz.

Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* expuestas a sequía

Anteriormente se ha sugerido que la presencia de cuerpos lipídicos de hongos en raíces de plántulas expuestas a sequía favorecen en el pasto la tolerancia a esta condición extrema, ya que son utilizados como intercambio de carbono planta - hongo (Barrow, 2003). Este autor observó estas estructuras esféricas en lugar de estructuras de hongos, en elementos cribosos de plantas provenientes de sequía.

De acuerdo a Barrow (2003) las estructuras atípicas no tienen una pared celular bien definida, así que el aumento de la permeabilidad del complejo pared-membrana puede mejorar la capacidad de intercambio y transporte de nutrientes y agua con la planta. Además se puede pensar que estas estructuras son más sensibles a condiciones de estrés que las otras estructuras formadas por el hongo. Así que se espera mayor presencia de estructuras atípicas en raíces de plántulas con no

reducción de hongos por calor y no expuestas a sequía, y mayor colonización por hifas melanizadas, esporas y microesclerocios en raíces de plántulas con reducción de hongos endófitos por calor y expuestas a sequía, como manera de protección del hongo ante condiciones severas. Esas observaciones coinciden parcialmente con los resultados de esta investigación, ya que la colonización por hifas y esporas es mayor en raíces de plántulas con reducción de hongos endófitos por calor y expuestas o no a sequía.

De manera general la biomasa del pasto también se afectó negativamente cuando las plántulas se expusieron a sequía, se podría decir que se afectó la funcionalidad del hongo y éste experimentó estrés al igual que la planta por la condición extrema, como ocurrió en (Rudgers & Swafford, 2009) independiente del porcentaje de colonización o estructura formada en la raíz. La biomasa de la raíz se favoreció cuando las plántulas no se expusieron a sequía, por lo que se pensaría que el porcentaje de colonización por estructuras atípicas tuvo influencia en esta variable, ya que son estructuras activas de los HESO que permiten el intercambio de agua con la planta de manera más fácil (Barrow, 2003). Aunque es posible que se puedan observar efectos más claros de este grupo de hongos en el crecimiento de la raíz, si el pasto es sometido a condiciones intermedias de estrés por sequía. En la relación biomasa aérea/raíz, la parte aérea se favoreció más que la raíz en plántulas con reducción de endófitos, esto puede estar asociado a la cantidad de hifas y esporas encontradas. Sun et al., (2010) encontró repuestas similares de la col china inoculada con *Pirifomospora indica* en las raíces y con riego permanente, tuvo alta colonización de hifas y esporas. De acuerdo a Rodríguez et al., (2009a) los endófitos pueden tener efecto en la regulación del crecimiento como en la mayor asignación de recursos a ciertas partes de la planta. En este experimento se esperaba que los endófitos favorecieran el crecimiento de la raíz en estrés por sequía para extraer mayor cantidad de agua del suelo, pero es posible que esta condición fue tan severa que hizo que la planta perdiera su capacidad de regulación del crecimiento asimétrico (Xu et al., 2010).

Bajo sequía, el contenido relativo de agua en hojas también fue afectado negativamente, es probable que los hongos tuviesen un costo funcional en el mejoramiento de la distribución o conservación del agua en la planta. Kannadan & Rudgers (2008), encontraron que el contenido relativo de agua en hojas fue mayor en plantas no inoculadas con endófitos que con endófitos en baja cantidad de agua, contrario sucedió en (Husaini et al., 2012) donde los endófitos tuvieron efectos positivos en esta variable en sequía.

La presencia de hifas melanizadas y cuerpos lipídicos pueden estar asociadas a la producción de enzimas antioxidantes activadas por el hongo (Sun et al., 2010), lo que evita el daño oxidativo de la clorofila o muerte celular. Esta respuesta puede ayudar a que las plantas no sean infectadas por patógenos. La exposición de las plántulas a sequía generó menor número y diámetro de raíces adventicias. Kannadan & Rudger, (2008) no encontraron efectos del hongo en el diámetro de la raíz ni en la longitud de pelos radiculares tanto en baja o alta disponibilidad de agua. Aunque en este experimento no se tuvo en cuenta la longitud ni el número de pelos radiculares, pudieron ser estas estructuras de la raíz (cumplen la función de absorción de agua del suelo) en las que los hongos endófitos septados oscuros tuvieron efecto en la tolerancia del pasto a esta condición extrema.

Es posible que el efecto de los hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto a la sequía, se visualice más fácilmente por los síntomas que muestran las hojas ante esta condición extrema. Las plántulas con reducción de los hongos

endófitos y expuestas a sequía mostraron enrollamiento temprano de las hojas. Este mecanismo de defensa del pasto pudo ser una manera de conservar la humedad como consecuencia a bajos porcentajes en contenido relativo de agua en las hojas. La reducción de los hongos endófitos por calor no permitió que estos manejaran eficientemente el agua disponible en el suelo (Rodríguez et al., 2008) y así evitar el marchitamiento temprano de las hojas. Adicional a esto la falta de agua dificulta la movilización de N en las plantas haciendo que las hojas se vuelvan cloróticas.

Efecto de la reducción por calor de HESO en el desempeño de plántulas de *B. decumbens* en dos suelos con fertilidad variable.

Cuando las plántulas fueron sembradas en suelo con fertilidad baja, no se encontró presencia de cuerpos lipídicos de hongos y las demás estructuras estaban en menor cantidad que en plántulas sembradas en suelo con fertilidad alta. En este estudio, el suelo con fertilidad baja presentaba bajas concentraciones de P y altas cantidades de N. Es posible que el P disponible fue utilizado por la planta o por el hongo en la formación de membranas lipídicas para el desarrollo de hifas más que para lípidos de almacenamiento (Olsson et al., 1997) y la concentración del N influyó en la colonización de estructuras atípicas, hifas melanizadas y esporas de los hongos endófitos septados oscuros. La melanina producida por los hongos septados oscuros es derivada de la tirosina que está compuesta de nitrógeno (Bell & Wheeler, 1986). Olsson, (1997) y colaboradores encontraron que la aparición de cuerpos lipídicos y la colonización de micorrizas se ven afectados negativamente por altos niveles de P en el suelo, mientras que en Rasmussen, (2008) y colaboradores la alta concentración de N aumentó la presencia de lípidos, pero disminuyó la concentración de hongos endófitos.

La siembra de las plántulas en suelo con fertilidad baja afectó de manera drástica la biomasa y la altura del pasto, por lo que se pensaría que tanto los hongos endófitos septados oscuros como las plantas experimentaron mayor estrés bajo esta condición extrema. Esto debido a la deficiencia de nutrientes como Mg, Ca, K y P, que pudo influir en la presencia de mayor disponibilidad de aluminio y menor captación de estos elementos por la raíz (Casierra & Aguilar, 2007), respecto al suelo con fertilidad alta. Sin embargo la reducción de los hongos endófitos afectó negativamente el peso seco de la raíz como el aéreo en suelo con fertilidad baja. En Rahman & Saiga (2007) plantas de *Lolium arundinaceum* no infectadas con hongos endófitos y sembradas en suelo con bajos niveles de P y altos niveles de N tuvieron menor peso seco radicular y mayor relación biomasa raíz/aérea que las plantas infectadas. También es posible que estos hongos tengan mayor efecto en la planta en el crecimiento de la raíz, cuando la disponibilidad de los nutrientes son adecuados (Jumpponen et al, 1998). Sin embargo, la prueba de esa especulación está por fuera de los alcances de esta investigación.

El número y diámetro de raíces adventicias también se afectaron negativamente en las plántulas que se sembraron en suelo con fertilidad baja, independientemente de si se redujeron o no los hongos endófitos por calor. La presencia de valores más altos de Al y menores de Ca y P que los del suelo con fertilidad alta pudo ser la causa de este comportamiento ya que altos niveles de Al inhibe el crecimiento radicular. En Guerras & Chacon (2012), encontraron que plantas de *B. decumbens* sembradas en

suelo con niveles de 1,8 meq/100g de Al (considerado valor alto) y 61 mg/kg de P tuvieron menor biomasa seca de raíz y longitud radicular al compararse con las sembradas en suelos con niveles de 0,6 meq/100g de Al (considerados valor medio) y 10 mg/kg de P. Cuando al pasto lo inocularon con micorrizas y lo sembraron en los mismos suelos estas variables tuvieron comportamiento similar. Sin embargo, Mejía, (2009) y colaboradores, no encontraron diferencia en el diámetro de la raíz entre progenies de *B. decumbens*, mejor y menor adaptadas a suelos con baja (2,7 mg/kg) o alta (18,2 mg/kg) disponibilidad de P y presencia de aluminio (1,1 meq/100g).

Los síntomas de deficiencia en las plántulas sembradas en suelo con fertilidad alta eran característicos de deficiencia por nitrógeno ya que, se presentó clorosis en las hojas viejas comenzando en la punta de las hojas y se extendió al resto de la hoja provocando la muerte de la misma (Rao et al., 1998). La deficiencia de N posiblemente se explica por los niveles bajos de materia orgánica, N-NO₃ y N-NH₄ al compararse con los del suelo de fertilidad baja. Sin embargo esto no afectó drásticamente la biomasa de las plántulas, así que tanto el pasto como los hongos aprovecharon la mayor disponibilidad de los nutrientes en este suelo. No es claro el tipo de deficiencia mostrada en plántulas sembradas en suelo con fertilidad baja. Pero es posible que la reducción de los hongos endófitos hizo que la planta no aprovechara eficientemente la poca disponibilidad de nutrientes, haciendo que los síntomas en las hojas se presentaran más rápidamente, que en las plántulas sin reducción de los hongos endófitos.

Es posible que el efecto de los hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto a la fertilidad baja del suelo, se visualice más fácilmente por los síntomas que muestran las hojas ante esta condición extrema, como también en el peso seco de la raíz y la altura de la planta.

3.7 Conclusiones

La exposición del pasto a condiciones extremas como la sequía y la baja fertilidad general del suelo tienen efecto negativo en la fisiología del pasto y en el porcentaje de colonización con estructuras de los hongos endófitos septados en las raíces.

El efecto de los hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto a la baja fertilidad del suelo, se presenta en las variables peso seco de la raíz, en la altura de las plántulas y en los síntomas de deficiencia nutricional que muestran las hojas ante esta condición extrema.

El efecto de los hongos endófitos septados oscuros en la tolerancia del pasto a la sequía, se presenta en las variables cantidad de especies reactivas de oxígeno y síntomas de estrés en hojas.

El conocimiento más profundo del efecto de estos hongos dependerá en buena medida de la disponibilidad de controles experimentales apropiados, libres de endófitos. Para ello no parecen existir estrategias claras, ya que los tratamientos, incluso con fungicida no los erradican completamente o pueden dañar las semillas.

Bibliografía

- Abdel-Raheem, A., & Shearer, C. A. (2002). Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Divers* 11: 1-19.
- Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra*, 13(3): 179-19
- Altieri, M., & Nicholls, C. (2008). Los impactos del cambio climático sobre las comunidades campesinas y de agricultores tradicionales y sus respuestas adaptativas, *Agroecología*.; 3: 7-28.
- Amézquita, E.; Rao, I. M.; Rivera, M.; Corrales, I. I.; Bernal, J. H. (2013). Sistemas Agropastoriles: Un enfoque integrado para el manejo sostenible de Oxisoles de los Llanos Orientales de Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Valle del Cauca, Colombia. 167 p.
- Andrade-Linares, D. R., Grosch, R., Restrepo, S., Krumbein, A., & Franken, P. (2011). Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza*, 21(5): 413-422.
- Ayarza, M. (1991). Efecto de las propiedades químicas de los suelos ácidos en el establecimiento de las especies forrajeras. En: Establecimiento y renovación de pasturas: conceptos, experiencias y enfoque de la investigación, Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, Sexta Reunión del Comité Asesor. CIAT. Cali, Valle del Cauca, Colombia. pp. 161-185.
- Barbosa, E. G., Pivello, V. R., & Meirelles, S. T. (2008). Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian cerrados. *Braz Arch Biol Technol*, 51(4): 625-631.
- Barney, D. L. (2003). Effects of light, surface sterilization, and fungicides on the germination of black huckleberry seeds. *Small Fruits Rev.* 2(2): 73-80.
- Barrow, J. R. (2003). Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*. 13(5):239-247.
- Barrow, J. R., Osuna, A. P.; Reyes, V. I. (2004). Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *Bouteloua eriopoda* Torr. And *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 40(6): 608-612.

- Bayman, P., Gonzalez, E. J., Fumero, J. J.; Tremblay, R. L. (2002). Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *J Ecol.* 90(6): 1002-1008
- Bell, A. A. & Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol.* 24(1):411-451.
- Bernal, J. & Espinosa, J. (2003) Manual de nutrición y fertilización de pastos. Potash and Phosphate Institute of Canada. 94 p.
- Biondini, M. (1988). Carbon and nitrogen losses through root exudation by *Agropyron cristatum*, *A smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Soil Biol Biochem.* 20(4): 477-482.
- Boddey, R. M., Rao, I. M.; Thomas, R. J. (1998). Reciclaje de nutrientes e impacto ambiental de las pasturas de *Brachiaria*. En: Miles, J., Maass, B., do Valle, C.; Kumble, V. eds. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT. Cali, Valle del Cauca, Colombia. pp: 79-96.
- Casierra, F. & Aguilar, O. (2007). Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. Una revisión, *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.* 1(2):246-257.
- Cheplick, P. (2004). Recovery from drought stress in *Lolium perenne* (poaceae): are fungal endophytes detrimental?. *Am. J. Bot.* 91(12): 1960–1968.
- Cheplick, G. P., Clay, K. & Marks, S. (1989). Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytol.* 111(1), 89–97.
- Cheplick, G. P., Perera, A.; Koulouris, K. (2000). Effect of drought on the growth of *Lolium perenne* genotypes with and without fungal endophytes. *Funct. Ecol.* 14(6): 657-667.
- Cheplick, G. P. (2011). Endosymbiosis and population differentiation in wild and cultivated *Lolium perenne* (Poaceae). *Am J Bot.* 98(5): 829-838
- Cuadrado, H., Kergulen, S., Contreras, A., Romero, A.; García J. (2003). Manejo agronómico de algunos cultivos forrajeros y técnicas para su conservación en la región caribe Colombiana. Manual técnico. CORPOICA. 2ed. Siglo 21. Cereté, Córdoba, Colombia.
- Encuesta Nacional Agropecuaria - ENA. En: Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2013). [Consultada en abril de 2015]. Disponible en: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2013/cp_ena_2013.pdf
- Della Monica, I. F., Saparrat, M. C., Godeas, A. M., & Scervino, J. M. (2015). The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecol.* 17:10-17.
- Diene, O., Sakagami, N.; Narisawa, K. (2014). The Role of Dark Septate Endophytic Fungal Isolates in the Accumulation of Cesium by Chinese Cabbage and Tomato Plants under Contaminated Environments. *PLoS One.* 9(10): e109233

- Ekblad, A. L. F., Wallander, H., & Näsholm, T. (1998). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytol.* 138(1):143-149.
- Ernst, M., Mendgen, K. W.; Wirsel, S. G. (2003). Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Mol Plant Microbe Interact.* 16(7): 580-587.
- Faria, J. (2006). Manejo de pastos y forrajes en la ganadería de doble propósito. En: X Seminario de Pastos y Forrajes. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela. pp: 1-9.
- Fernández, M. (2013). Efectos del cambio climático en el rendimiento de tres cultivos mediante el uso del Modelo AquaCrop. En: IDEAM. [Consultada en enero de 2016]. Disponible en: http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21138/Informe+Final_+Efectos+del+CC+en+el+rendimiento+de+cultivos+agr%C3%ADcolas.pdf/77713cce-eef6-4eb9-9ad6-02985c72b76b
- Gallego, J., Perea, L., & Pérez, J. (2012) "Simbiosis con hongos septados oscuros y micorrizas en raíces de *Pennisetum clandestinum*". Memorias, Evento: Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Colombia.
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G.; Lemanceau, P. (2003). Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie.* 23(5-6): 407-418.
- Gamboa Gaitan, M. A., Wen, S., Fetcher, N.; Bayman, P. (2005). Effects of fungicides on endophytic fungi and photosynthesis in seedlings of a tropical tree, *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Acta Biolo Colomb.* 10(2): 41-48.
- Gibert, A., & Hazard, L. (2011). Endophyte infection of *Festuca eskia* enhances seedling survival to drought and cutting at the expense of clonal expansion. *Journal of Plant Ecology*, 4(4): rtr009
- Giovanetti, M. Y. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84(3):489-500.
- Groleau-Renaud, V., Plantureux, S.; Guckert, A. (1998). Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant Soil.* 201(2): 231-239.
- Guenni, O., Marín, D., & Baruch, Z. (2002). Responses to drought of five *Brachiaria* species. I. Biomass production, leaf growth, root distribution, water use and forage quality. *Plant Soil*, 243(2): 229-241.
- Guenni, O., Baruch, Z.; Marín, D. (2004). Responses to drought of five *Brachiaria* species. II. Water relations and leaf gas exchange. *Plant Soil.* 258(1):249-260.
- Guenni, O., Baruch, Z., Márquez, L.; Nuñez, C. (2006). Respuestas al déficit hídrico en especies forrajeras de *Brachiaria* (Trin) Griseb. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América.* 31(7):505-511.
- Guerras, B. E. & Chacon, M. R. (2012). Simbiosis micorrízica arbuscular y acumulación de aluminio en *Brachiaria decumbens* y *Manihot esculenta*. *Rev. Bio. Agro* 10(2): 87-98.

- Gutiérrez, C., Herrera, J.; Alizaga, R. (2006). Optimización de las condiciones de germinación de cuatro especies de pastos tropicales I. *Brachiaria decumbens* y *B. bryzantha*. *Tecnología en Marcha*, 19(2): 41.
- Hadacek, f., & Kraus, G. (2002). Plant root carbohydrates affect growth behaviour of endophytic microfungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 4: 161 – 170
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 597-607.
- Heist, E. P., Nesmith, W. C.; Schardl, C. L. (2002). Interactions of *Peronospora tabacina* with roots of *Nicotiana spp.* in gnotobiotic associations. *Phytopathology*. 92(4): 400-405.
- Henry, A., Doucette, W., Norton, J., Jones, S., Chard, J.; Bugbee, B. (2006). An axenic plant culture system for optimal growth in long-term studies. *J. Environ. Qual.* 35: 590-598.
- Hepper, C. M. (1981). Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88(4): 641-647.
- Husaini, A., Abdin, M., Khan, S., Xu, Y., Aquil, S.; Anis, M. (2012). Modifying strawberry for better adaptability to adverse impact of climate change. *Curr. Sci.* 102:1660–1673.
- Jeliazkova, E & Percival, D. (2003). Effect of drought on ericoid mycorrhizae in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Can. J. Plant Sci.* 83(3):583-586.
- Jumpponen, A. & Trappe, J. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140:295–310. Jumpponen, A., Mattson, K.; Trappe, J. (1998). Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza*. 7:261–265
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes – are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza* 11: 207–211
- Kannadan, S. & Rudgers, J. A. (2008). Endophyte symbiosis benefits a raregrass under low water availability. *Funct. Ecol.* 22(4):706-713.
- Keller-Grein, G., Maass, B.; Hanson, J. (1998). Variación natural en *Brachiaria* y banco de germoplasma existente. En: Miles, J., Maass, B., do Valle, C., Kumble, V. eds. *Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento*. CIAT. Cali, Valle del Cauca, Colombia. pp: 18-45.
- Kjøller, R., & Rosendahl, S. (2000). Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biol. Fertil. Soils.* 31(5): 361-365.
- Kloeper, J. W., & Schroth, M. N. (1981). Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*. 71: 642-644.

- Knapp, D., Pintye, A.; Kovacs, G. (2012). The dark side is not fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of native and invasive plants of Semiarid Sandy Areas, *PloS One*, 7(2), e32570
- Knudson, L. (1929). Seed germination and growth of *Calluna vulgaris*. *New Phytol.* 28(5): 369-376.
- Latch, G. C., & Christensen, M. J. (1982). Ryegrass endophyte, incidence, and control. *New Zeal J Agr Res.* 25(3): 443-448. Li, X., Ren, A., Han, R., Yin, L., Wei, M.; Gao, Y. (2012). Endophyte-mediated effects on the growth and physiology of *Achnatherum sibiricum* are conditional on both N and P availability. *PloS One*, 7(11), e48010.
- Lv, Y. L., Sun, L. H., Zhang, F. S., Zhao, Y., & Guo, S. X. (2010). The effect of cultivation conditions on the mycelial growth of a dark-septate endophytic isolate. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(8), 602-607.
- Mahmoud, R., & Narisawa, K. (2013). A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions. *PloS One.*; 8(11): e78746
- Mandyam, K. & Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol*, 53:173-189.
- Mandyam, K., Loughin, T., & Jumpponen, A. (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4), 813-821.
- Mejía, K., S., Rao, I., Ramírez, H., Louw-Gaume, A., Gaume, A.; Frossard, E. (2009). Atributos morfológicos y fisiológicos de genotipos de *Brachiaria* en un suelo con bajo fósforo disponible y alta saturación de aluminio. *Acta Agronómica.* 58(1):1-8.
- Mergulhao, A., Burity, H. A., Tabosa, J. N., Figueiredo, M.; Maia, L. C. (2001). Salt stress response of *Brachiaria* plants with and without inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agrochimica-Pisa-*, 45(1/2): 24-31.
- Misaghi, I. J., & Donndelinger, C. R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80(9), 808-811.
- Morse, L. J., Day, T. A., & Faeth, S. H. (2002). Effect of *Neotyphodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environ Exper Bot*, 48(3): 257-268.
- Newsham, K. (1999). *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *Ambigua*. *New Phytologist.* 144: 517-524
- Newsham, K., Upson, R.; Read, D. (2009). Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecol.* 2:10 – 20
- Olsson, P. A., Baath, E.; Jakobsen, I. (1997). Phosphorus effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus as studied in the soil and roots by analysis of Fatty Acid signatures. *Appl Environ Microbiol*, 63(9):3531-3538.

- Palková, Z. (2004). Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep*, 5(5): 470-476.
- Passos, L., Marini, M., Coletta, M., De Souza, F., Marques, R., & Martins do Vale, N. (2009). Assessment of disinfectant efficiency and influence on the germination of *Brachiaria* seeds for in vitro culture purposes. Memorias, Evento: International anual meetings. Footprints in the landscape: Sustainability through plant and soil sciences. Pittsburgh, USA.
- Pointing, S. B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers*. 2: 17-33
- Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P. H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., & Oelmüller, R. (2004). Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmicreticulum and at the plasma membrane. *Physiol. Plant*, 122(4): 465-477.
- Porras, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R., Odenbach, K., Lowrey, T.; Natvig, D. (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Appl Environ Microbiol* 74(9): 2805–2813
- Postma, J. W., Olsson, P. A.; Falkengren-Grerup, U. (2007). Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biol Biochem*. 39(2):400-408.
- Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo, PNUD. Proyecto de integración de riesgos y oportunidades del cambio climático procesos nacionales de desarrollo y en la programación de país de las Naciones Unidas. 2010. Colombia. [Consultada en Febrero de 2015] Disponible en: http://www.pnud.org.co/img_upload/61626461626434343535373737353535/Brochure%20resumen%20Proyecto.pdf
- Proost, R., & Smit, D. (2013). Fungicide resistance management in corn, soybean, and wheat in Wisconsin. University of Wisconsin. [Consultada en Marzo de 2015] Disponible en: <http://ipcm.wisc.edu/download/pubsPM/A3878FungicideResistance.pdf>. pp: 1-8
- Rahman, M. H. & Saiga, S. (2007). Endophytic fungi affect root characteristics of tall fescue grown in andisols. *Int. J. Agric. Res*. 2(6):545-551.
- Rao, I.M. (2001). Adapting tropical forages to low-fertility soils. In: Proceedings of the XIX International Grassland Congress. Gomide, J.A., Mattos, W.R.S.; da Silva, S.C. Brazilian Society of Animal Husbandry. Piracicaba, Brazil. pp: 247–254.
- Rao, I. M., Kerridge, P. C.; Macedo, M. C. M. (1998). Requerimientos nutricionales y adaptación a los suelos ácidos de especies de *Brachiaria*. En: Miles, J., Maass, B., do Valle, C., Kumble, V. eds. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT. Cali, Valle del Cauca, Colombia. pp: 58-78.
- Rasband, W.S. (2007). IMAGEJ, US. [En línea] National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. [Consultada en Agosto de 2014]. Disponible en: <http://rsbweb.nih.gov/ij/2007>.

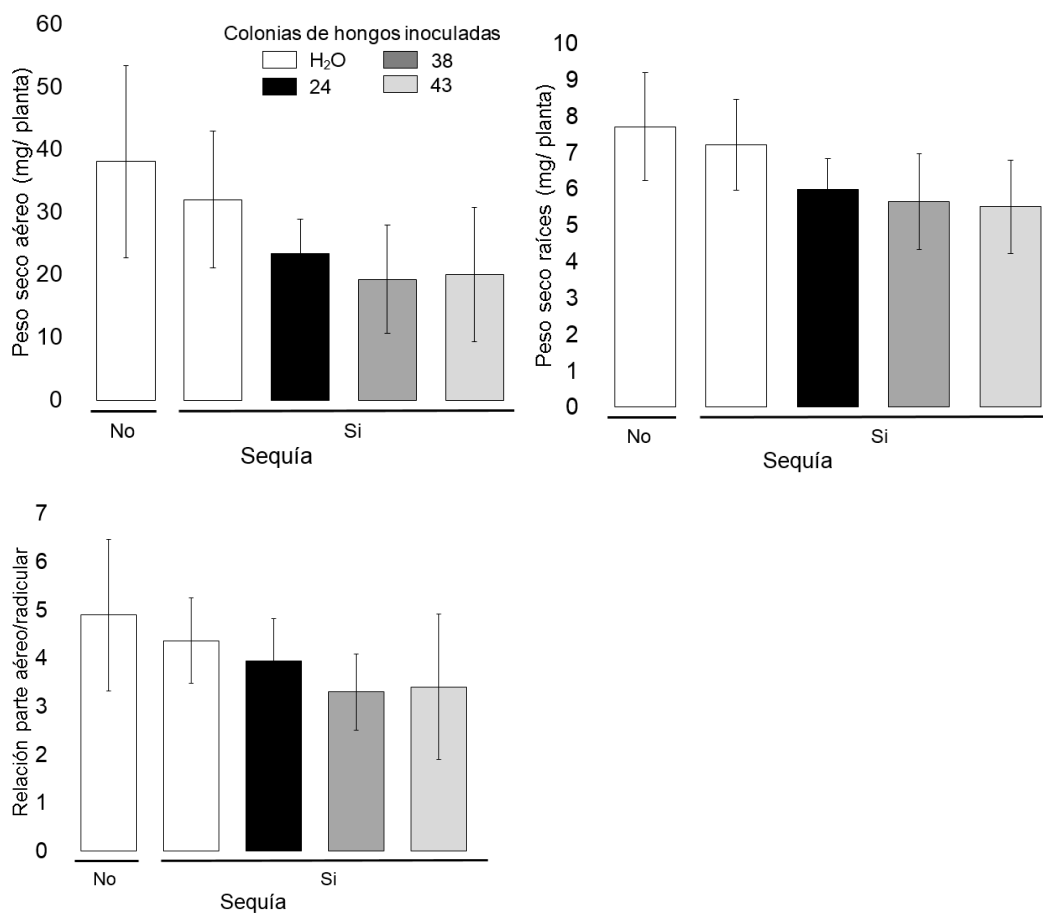
- Rasmussen, S., Parsons, A. J., Fraser, K., Xue, H.; Newman, J. A. (2008). Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte infection. *Plant Physiol.* 146(3):1440-1453.
- Rayner, M. C. (1929). The biology of fungus infection in the genus *Vaccinium*. *Ann Bot.* 43(169): 56-69.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J.; Henson, J. M. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298(5598): 1581-1581.
- Redman, R. S., Kim, Y. O., Woodward, C. J., Greer, C., Espino, L., Doty, S. L.; Rodriguez, R. J. (2011). Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. *PLoS One.* 6(7):e14823
- Rincón, A. (1999). Degradación y recuperación de praderas en los llanos orientales de Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. CORPOICA. Villavicencio, Meta, Colombia.
- Roche, R., Menéndez, J., & Hernández, J. E. (1990). Características morfológicas indispensables para la clasificación de especies del género *Brachiaria*. *Pastos y Forrajes*, 13(3).
- Rodríguez, I. D. C., & Rodríguez-López, N. (2006). Nuevas perspectivas para el estudio de la asignación de biomasa y su relación con el funcionamiento de plantas en ecosistemas neotropicales. *Acta biológica colombiana*, 11, 75.
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F.; Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in plants via hábitat - adapted symbiosis. *ISME J.* 2(4):404-416.
- Rodriguez, R. J., Redman, R. S.; Henson, J. M. (2004). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation Adapt. Strateg. Glob. Chang.* 9(3):261-272.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E.; Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182(2):314-330.
- Rodriguez, R., Freeman, D. C., McArthur, E. D., Kim, Y. O.; Redman, R. S. (2009a). Symbiotic regulation of plant growth, development and reproduction. *Commun Integr Biol.* 2(2):141-143.
- Rudgers, J. A. & Swafford, A. L. (2009). Benefits of a fungal endophyte in *Elymus virginicus* decline under drought stress. *Basic Appl. Ecol.* 10(1):43-51.
- Sandnes, A., & Eldhuset, T. D. (2003). Soda glass beads as growth medium in plant cultivation experiments. *J Plant Nutr Soil Sc.* 166(5): 660-661.
- Sánchez, P. A., & Salinas, J. G. (1983). Suelos ácidos: estrategias para su manejo con bajos insumos en América tropical. *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo*, Bogotá, Colombia. pp 7 y 41.

- Sauer, D. B., & Burroughs, R. (1986). Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology*. 76(7): 745-749.
- Scervino, J., Gottlieb, A., Silvani, V., Pergola, M., Fernandez, L., & Godeas, A. (2009). Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biol Biochem*, 41:1753–1756
- Schadt, C., Mullen, R., & Schmidt, S. (2001). Isolation and phylogenetic identification of a dark-septate fungus associated with the alpine plant *Ranunculus adoneus*. *New Phytol*. 150: 747–755
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A.; Oelmüller, R. (2008). The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Arabidopsis by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 21(6):799-807.
- Society of American Bacteriologists. (1951). Manual of methods for pure culture study of bacteria. *Biotech Publications*, New York.
- Sieber, T. N. & Grünig, C. R. (2006). Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s.l. In: Schulz, B., Boyle, C.; Sieber, T. eds. *Microbial Root Endophytes*. Springer Berlin Heidelberg. pp: 107-132.
- Silvani, V., Fracchia, S., Fernández, L., Pérgola, M & Godeas, A. (2008). A simple method to obtain endophytic microorganisms from field - collected roots. *Soil Biol Biochem*. 40: 1259-1263.
- Simons, M., Van Der Bij, A. J., Brand, I., De Weger, L. A., Wijffelman, C. A.; Lugtenberg, B. J. (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting Pseudomonas bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 9(7):600-607.
- Steen, E., & Larsson, K. (1986). Carbohydrates in roots and rhizomes of perennial grasses. *New Phytol*. 104(3): 339-346.
- Sun, C., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R.; Lou, B. (2010). *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *J Plant Physiol*. 167(12):1009-1017.
- Valério, J. R., Lapointe, S., Kelemu, S., Fernández, C., & Morales, F. (1998). Plagas y enfermedades de las especies de Brachiaria. Requerimientos nutricionales y adaptación a los suelos ácidos de especies de Brachiaria. En: Miles, J., Maass, B., do Valle, C., Kumble, V. eds. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT. Cali, Valle del Cauca, Colombia. pp 96-115
- Vázquez, G. A., Santiago-Martínez, G., Estrada, T. A. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 73(1):1-15

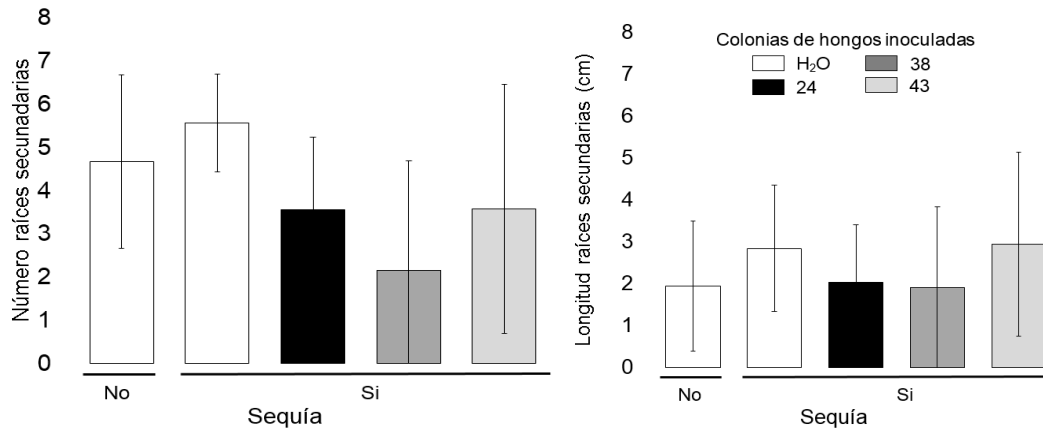
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U.; Piche, Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol.* 64: 5004-5007
- Wali P, Helander M, & Saikkonen K. Manipulation of *Epichloe/Neotyphodium* - endophyte infection in pooidgrasses. En: Pirttila, A. M. & Sorvari, S. (2011). *Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes, A Laboratory Manual, Part B: Fungi.* Paimio, Finland: *BioBien Innovations*, pp: 199-201.
- Welbaum, G. E. (2015). Vegetable production and practices. CABI. USA
- Wiewióra, B., Żurek, G.; Pańka, D. (2015). Is the vertical transmission of *Neotyphodium lolii* in perennial ryegrass the only possible way to the spread of endophytes?. *PLoS One.* 10(2): e0117231.
- Willmann, M., Gerlach, N., Buer, B., Polatajko, A., Nagy, R., Koebke, E.; Bucher, M. (2013). Mycorrhizal phosphate uptake pathway in maize: vital for growth and cob development on nutrient poor agricultural and greenhouse soils. *Front. Plant Sci.* 4:533
- Xu, Z., Zhou, G.; Shimizu, H. (2010). Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal Behav.* 5(6): 649-654.
- Yamamoto, T., Yokotani-Tomita, K., Kosemura, S., Yamamura, S., Yamada, K., & Hasegawa, K. (1999). Allelopathic substance exuded from a serious weed, germinating barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* L.), roots. *J Plant Growth Regul.* 18(2): 65-67.
- Yuan, Z. L., Zhang, C. L., Lin, F. C., & Kubicek, C. P. (2010). Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 76(5): 1642-1652
- Zapata, H. R. (2002). Química de la acidez del suelo. [Consultada en Abril de 2016] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1735/1/9583367125.1.pdf>
- Zengler, K. (2009). Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73(4): 712-729.
- Zhan, F., He, Y., Zu, Y., Li, T., & Zhao, Z. (2011). Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World J Microbiol Biotechnol.* 27(10): 2483-2489.

Anexos

Anexo 1: Efecto de la inoculación de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en la biomasa de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=10 en cada tratamiento).



Anexo 2: Efecto de la inoculación de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en la morfología de raíces secundarias de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=10 en cada tratamiento).



Anexo 3: Efecto de la inoculación de los hongos endófitos septados oscuros 24, 38 y 43 en la morfología de raíces adventicias de plántulas de *B. decumbens* sometidas a sequía. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES) (n=10 en cada tratamiento).

