

EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA ERRADICAR HONGOS ENDÓFITOS DE RAÍCES EN SEMILLAS DE *Brachiaria decumbens* Stapf^a

EVALUATION OF METHODS TO ELIMINATE ROOT ENDOPHYTIC FUNGI FROM SEEDS OF *Brachiaria decumbens* Stapf

DIANA TAMAYO^b, JUAN C. PÉREZ^c, ELIZABETH MENESES^d

Recibido 08-05-2017, aceptado 12-09-2017, versión final 19-09-2017.

Artículo Investigación

RESUMEN: La adaptación de plantas a ambientes extremos 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) para probar métodos de desinfección de semillas de *Brachiaria decumbens* en estudios con hongos endófitos de raíces. Con este sistema se evaluaron en semillas métodos de desinfección externa (Soluciones de NaOCl al 5 % ó Ca(ClO)₂ al 7.14 %, o calor [60°C] en baño de agua u horno en varios tiempos), e interna (CaptanTM 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 plántulas). Adicionalmente, los métodos de desinfección externa disminuyeron la actividad microbiológica superficial en semillas, comparado con el control (agua). Aplicar NaOCl (5 %) resultó en mayor germinación y desarrollo de plántulas, pero no fue posible eliminar estructuras internas de hongos de las raíces, 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.

ABSTRACT: Plant adaptation to extreme environmental conditions may depend on symbiotic root fungi. However research on this topic is hampered by the difficulties to obtain experimental plants free of endophytes. This study adapted and tested a system of seeds germination (SSG) of *Brachiaria decumbens* which allows evaluating seed disinfection methods for experimental purposes with this important tropical grass and its roots endophytes. The system called germination bags used inexpensive, locally available materials. Using seeds, this system evaluated external (5 % NaOCl, heat, 7.14 % Ca(ClO)₂) and internal (CaptanTM and Benomil 50WP (0.1 mg/ml)) disinfection methods. The results indicated that our SSG is suitable for the development of *B. decumbens* seedlings and yields abundant working plant material in five days. In addition the three external disinfection methods tested reduced the outer microbial activity

^aTamayo, D., Pérez, J. & Meneses, E. (2017). Evaluación de métodos para erradicar hongos endófitos de raíces en semillas de *Brachiaria decumbens* Stapf. *Rev. Fac. Cienc.*, 6(2), 87–101. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v6n2.64691>

^bFacultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. dmtamayol@unal.edu.co

^cLaboratorio Microbiología del Suelo. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. jcperez@unal.edu.co

^dCentro de Investigación Corporación Universitaria Minuto de Dios - Seccional Bello. elizabeth.meneses@uniminuto.edu

of the seeds as compared to a control treatment (water), with the use of 5 % NaOCl showing the highest germination rate of seeds per bag. Fungicide use as internal disinfection method did not eliminate root fungal internal structures, 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: Disinfection methods; fungal endophytes; germination bags; grasses; symbiosis

1. INTRODUCCIÓN

Muchas especies vegetales forman 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 común en el trópico alto y bajo de Suramérica, que comúnmente presenta raíces colonizadas por hongos septados, cuyo papel es desconocido. Estos hongos de los filos Ascomycota y Basidiomycota, poseen hifas melanizadas y septadas, forman microesclerocios (Jumpponen & Trappe, 1998) y son comunes en raíces de plantas en ambientes extremos, por ejemplo zonas con temperatura muy baja (Newsham *et al.*, 2009) o temperatura muy alta y suelos secos (Porrás *et al.*, 2008). Para entender el papel de esa simbiosis es prerequisite usar plantas libres de hongos como controles experimentales. Sin embargo, esos microorganismos son transmitidos y al parecer imposibles de erradicar del material de propagación (Barrow *et al.*, 2004). Para ello se han evaluado sistemas de propagación controlada que 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).

Para esterilizar componentes inertes del sistema a emplear se ha usado irradiación gama o autoclave (Henry *et al.*, 2006), mientras que para desinfectar semillas se han utilizado métodos térmicos (Misaghi & Donndelinger, 1990; Kannadan & Rudgers, 2008) o inmersión en soluciones diluidas de 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). 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 *et al.*, 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 inclusión de pruebas de verificación de 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

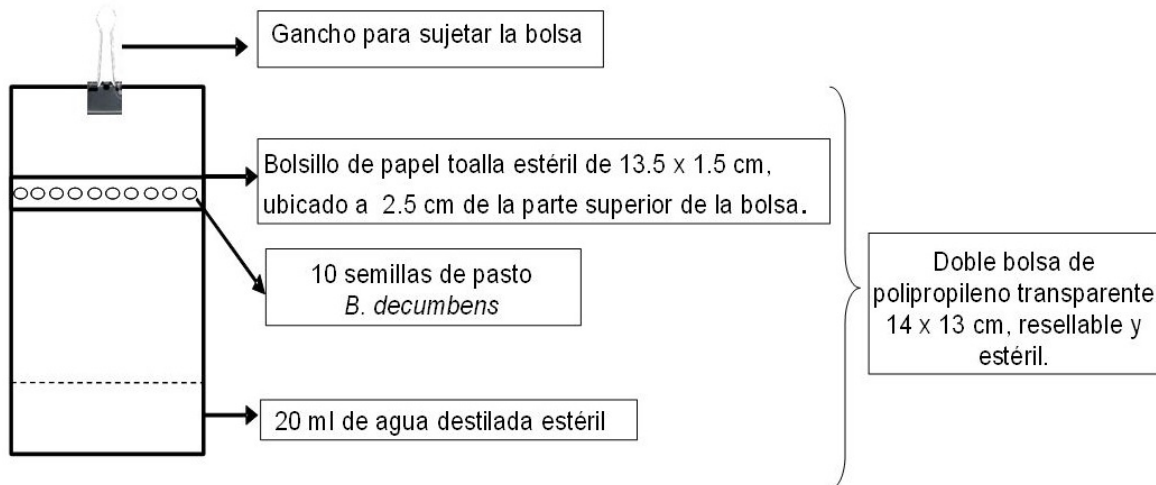


Figura 1: Sistema de germinación masiva de semillas de *B. decumbens*. Las semillas usadas tienen una longitud media de 3 mm.

Fuente: Elaboración propia.

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 simbiotes en raíces. Hasta el presente no existe un método económico y rápido para ello. En estudios anteriores con el pasto *B. decumbens* en los que se pretendía evaluar el papel de estos hongos endófitos en la tolerancia del pasto a condiciones extremas de sequía o nutrición, se encontró que todas las plantas incluidas en tratamientos control no inoculados, y obtenidas del mismo lote de semillas usadas aquí, presentaban una alta colonización por estos hongos, lo que limitó el poder concluir claramente sobre el papel de esta simbiosis en el desempeño de las plantas (Tamayo, 2017). El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema de germinación masivo 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. MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

El sistema es presentado como de germinación masiva, ya que cada bolsa con un conjunto de semillas ocupa el mismo volumen que una carpeta legajadora, de las cuales pueden apilarse hasta 50 en un gabinete regular para almacenar documentos. 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 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 sólo sobre el borde superior de la bolsa. Las variables medidas fueron: germinación de semillas (%) y crecimiento de raíces (cm) a los cinco días después de iniciada la prueba. Usando el software R se realizó una prueba t de student para comparar los promedios de las variables en los dos tratamientos.

2.2. Efectividad de métodos para la desinfección de semillas de *B. decumbens*

2.2.1. Desinfección superficial de semillas

Se tomaron conjuntos de 40 semillas que se sometieron a tratamientos previamente presentados en la literatura: solución de NaOCl al 5% (Simons *et al.*, 1996), $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 7.14% (Knudson, 1929), calor (Misaghi & Donndelinger, 1990), y agua destilada estéril (control). Las soluciones de hipoclorito de calcio o sodio se obtuvieron a partir de sales suministradas por la empresa Protokimica S.A. (www.protokimica.com). Se registró la actividad microbial 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.

2.2.2. Combinación de desinfección externa e interna de semillas

Consistió en cuatro experimentos independientes. En cada uno se evaluó un método de desinfección superficial 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 réplicas, cada una conformada por una bolsa de germinación con 10 semillas de *B. decumbens* (Figura 1), que se incubó por cinco días en las mismas condiciones descritas arriba. Los métodos de desinfección evaluados se presentan en la Tabla 1. Después de ese tiempo se determinó la germinación de semillas (%), longitud de raíces (cm) a partir de fotografías analizadas en el software libre ImageJ (Rasband, 2007), y actividad microbiológica interna de las semillas determinada indirectamente en fragmentos de raíces. Para estas últimas se tomaron de cada réplica las raíces con al menos 1 cm de longitud y se desinfectaron 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), se secaron sobre papel toalla estéril, se cortaron en fragmentos de 1 cm, y finalmente se tiñeron de acuerdo al método de Vierheilig *et al.* (1998). Se consideró una raíz colonizada si al menos uno de sus fragmentos presentaba estructuras de hongos. Los datos se presentan como la relación entre el número de raíces positivas y el total de raíces presentes en cada réplica.

Para diferenciar claramente estructuras formadas por los hongos endófitos en raíces, en el experimento

siguiente se usó la tinción doble (azul tripano-para hongos y Sudan IV-para lípidos) modificada de Barrow (2003).

2.2.3. Desinfección externa (NaOCl al 5 %) e interna (calor a diferentes tiempos)

Consistió en cinco tratamientos donde las semillas que se desinfectaron externamente con NaOCl al 5 % se mantuvieron a 60°C durante 10, 20 ó 30 minutos en baño de agua o durante 6 días en horno seco. Adicionalmente se incluyó un control a temperatura ambiente. Se utilizó un diseño completamente al azar y cada tratamiento con cinco repeticiones, cada una conformada por una bolsa de germinación con diez semillas de *B. decumbens* (Figura 1), que se incubó por ocho días en las mismas condiciones descritas anteriormente. Como variables se midieron la germinación de semillas (%), longitud de raíces y plúmula (cm) a partir de imágenes (Rasband, 2007), actividad microbiológica interna de las semillas por tinción doble presentada por Barrow (2003) y porcentaje de colonización (Giovanetti & Mosse, 1980) por hifas, esporas, cuerpos lipídicos y otras 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.

$$Colonizacin (\%) = \frac{Conteos\ positivos}{Conteos\ positivos + Conteos\ negativos} \times 100 \quad (1)$$

Tabla 1: Métodos de desinfección de semillas de *B. decumbens*.

Experimento	Método de desinfección superficial	Métodos de desinfección interna
I	NaOCl al 5 % (Simons et al., 1996)	Fungicida Captan TM ,
II	Calor (Misaghi y Donndelinger, 1990)	Fungicida Benomil 50WP,
III	Ca(ClO) ₂ al 7.14 % (Knudson, 1929)	Agua destilada estéril (control)
IV	Agua destilada estéril (testigo)	
Nota: Los fungicidas Captan y Benomil se emplearon a un concentración de 0.1mg/ml y se adicionaron al agua de las bolsas de germinación correspondientes.		

Para el análisis estadístico se revisaron los supuestos de normalidad de residuales y homogeneidad de varianzas previo al Anova. La variable longitud de raíz del experimento IV se transformó (logaritmo) para cumplir con los supuestos del Anova y todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico libre R (www.r-project.org).

3. RESULTADOS

3.1. 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 ± 0.8 cm. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos de temperatura evaluados (Figura 2), y en general el desarrollo de plántulas fue adecuado.

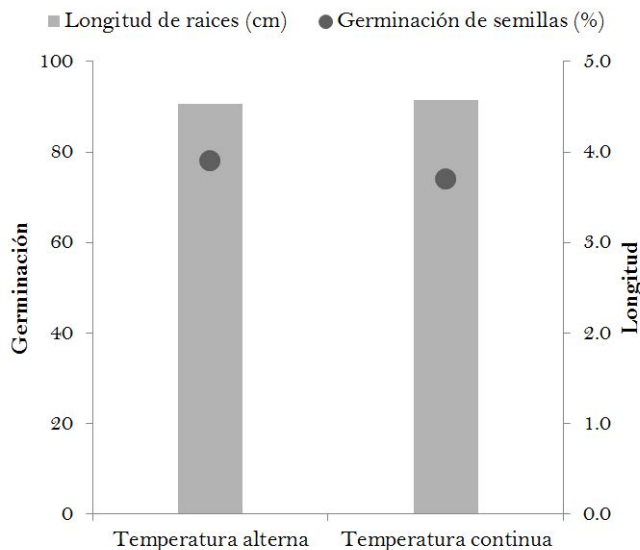


Figura 2: Germinación de semillas y longitud de raíces después de los tratamientos con temperatura alterna o continua. Fuente: Elaboración propia.

Además al usar bolsas transparentes dentro de carpetas oscuras pudieron revisarse superficialmente las raíces sin interrumpir el desarrollo del experimento.

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

3.2.1. Desinfección externa de semillas

Los tres métodos de desinfección externa disminuyeron diferencialmente la actividad microbial residual superficial en las semillas, en comparación con el tratamiento control con aplicación de agua. En general, ningún tratamiento individual fue completamente efectivo para eliminar simultáneamente bacterias y hongos cultivables durante 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 3).

3.2.2. 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 %. Pero en el tratamiento con calor las semillas no germinaron (Figura 4).

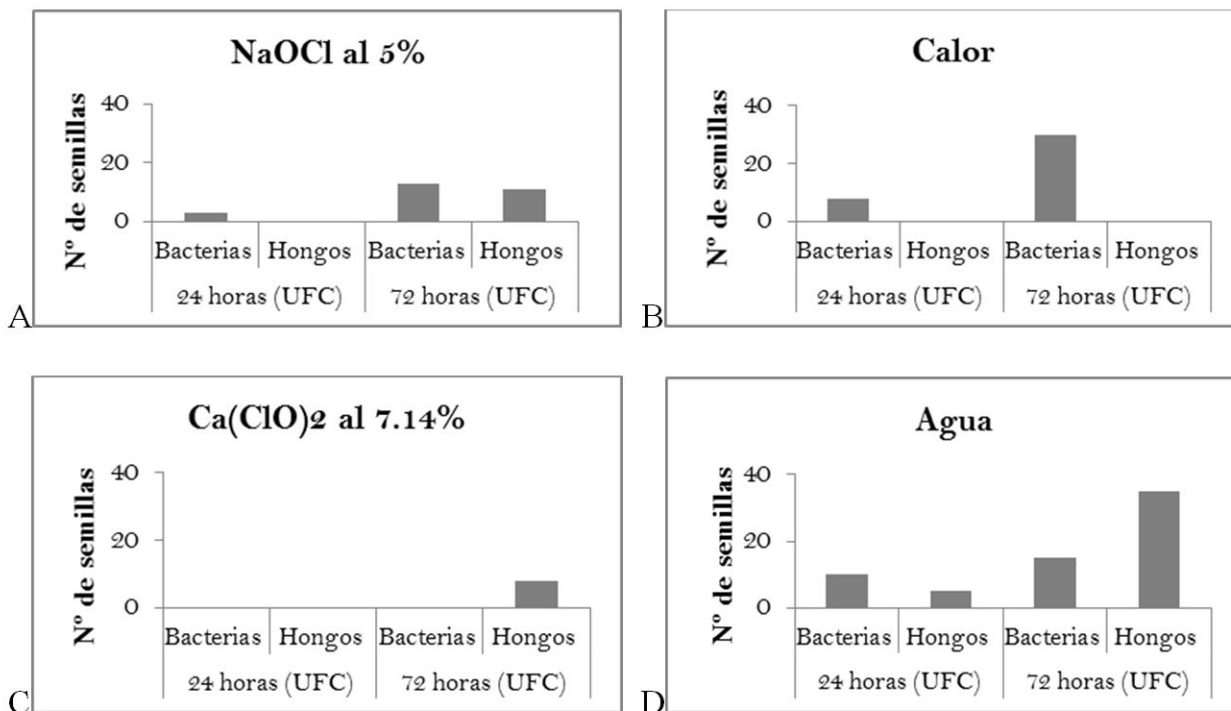


Figura 3: Actividad microbiana residual en la superficie de las semillas 24 y 72 horas después de aplicar métodos de desinfección externa en semillas de *B. decumbens*. Los paneles A, B y C representan tratamientos externos de desinfección. El panel D representa un control que recibió solo agua. El eje vertical indica el número de semillas que presentaron crecimiento de colonias de hongos o bacterias. Fuente: Elaboración propia.

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 tratamiento con 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 al aplicar benomil tuvo mayor longitud de la raíz en comparación al control ($p = 0.0042$). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4. 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 4), evidenciada por la presencia abundante de esporas de hongos endófitos en las raíces a los cinco días de germinadas las semillas.

3.2.3. Desinfección externa (NaOCl al 5 %) e interna (calor a diferentes tiempos)

La utilización de calor no eliminó totalmente los hongos endófitos de la raíz, sin embargo los tratamientos en 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, comparado con semillas no sometidas

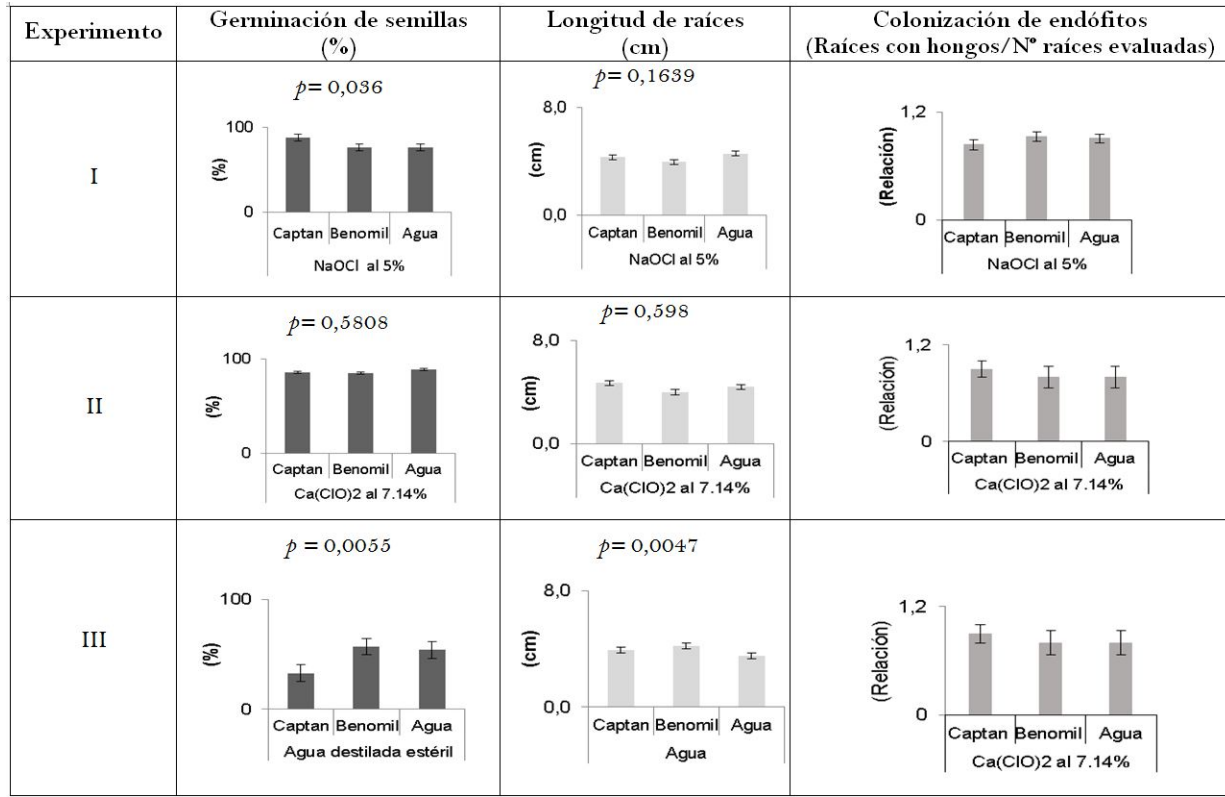


Figura 4: Germinación de semillas, longitud de raíces y colonización por hongos endófitos en raíces en cada tratamiento. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES), (n=300). Fuente: Elaboración propia.

a calor, aunque este último tratamiento tuvo efecto negativo significativo en la germinación de semillas, y longitud de la raíz ($p = 0.006$) y la plúmula ($p = 0.022$) (Figura 5).

La tinción dual permitió observar diferentes estructuras de los hongos endófitos en las raíces, con paredes quitinosas de color azul y nombradas por Barrow (2003) como atípicas, rodeando posibles cuerpos lipídicos, teñidos de color rojo. Esas estructuras fueron muy comunes en el tratamiento con agua, mientras que el tratamiento en horno presentó un mayor número de esporas.

4. DISCUSIÓN

Este estudio permitió adaptar un sistema para obtener plántulas de pasto *B. decumbens* en condiciones controladas, que permitirá evaluar en el laboratorio la efectividad de métodos o tratamientos, en menos de cinco días, para obtener plantas libres de hongos endófitos o al menos con niveles reducidos de ellos, y analizar así sus interacciones entre ellos o con las plantas. Adicionalmente, aunque al combinar algunos métodos fue posible reducir la colonización posterior de raíces por hongos endófitos, no fue posible obtener plantas libres de hongos endófitos. Estos resultados permitirían diseñar apropiadamente experimentos futuros para

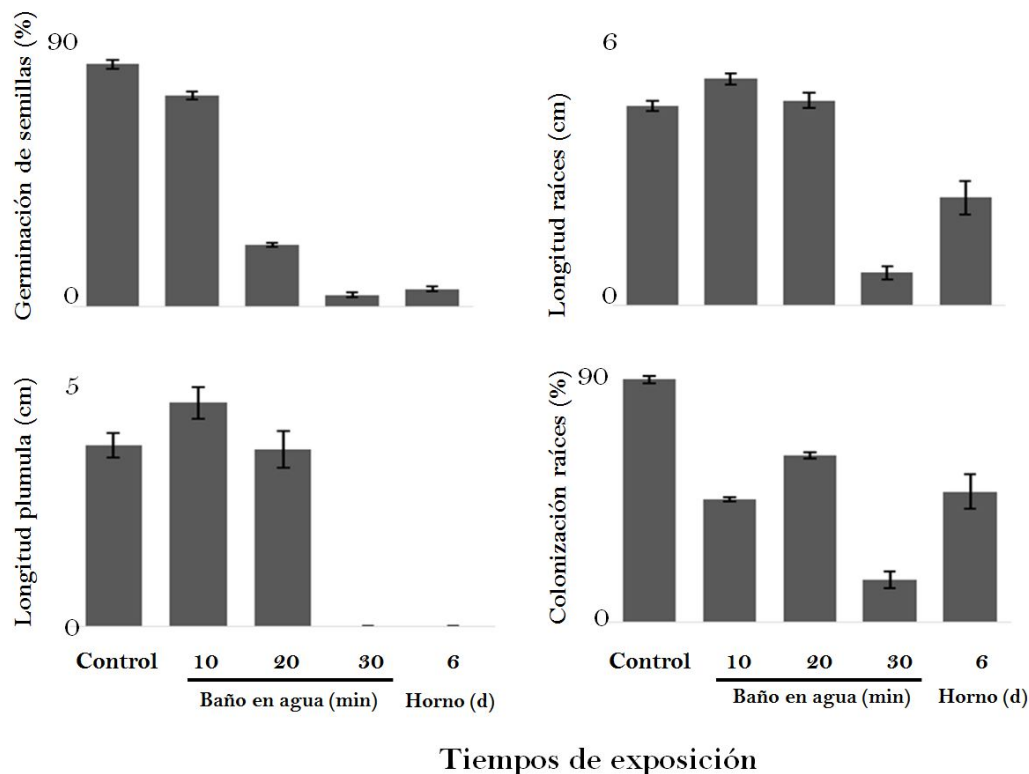


Figura 5: Desinfección de semillas de *B. decumbens* por calor en diferentes tiempos de exposición. Las barras en las columnas indican el error estándar (ES), (n=50 por tratamiento). Fuente: Elaboración propia.

evaluar en las simbiosis con plantas, el papel de estos hongos endófitos, que al menos para otras especies vegetales se han considerado como innatos e imposibles de erradicar con tratamientos probados en áreas como cultivo de tejidos vegetales (Barrow *et al.*, 2004).

Con respecto a la desinfección externa del material vegetal, la aplicación de sales como NaOCl y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ disminuyeron la presencia de hongos y bacterias en la superficie de las semillas de *B. decumbens* y favorecieron la germinación y desarrollo de las plántulas. Una posible razón para la eliminación apenas parcial de microorganismos superficiales puede deberse a que su efectividad dependió de la concentración de microorganismos que allí se encontraban. Sauer & Burroughs (1986), afirman que un alto número de esporas puede crear una barrera que impide la penetración del compuesto químico, así mismo, una alta concentración también puede producir muerte incompleta de esporas como resultado de una pérdida de contacto entre las esporas y el desinfectante, cuando este último no se agita lo suficiente con las semillas. Aunque el método de siembra en PDA como prueba para confirmar la desinfección superficial de las semillas es la más empleada en la literatura, no es la más apropiada ya que ciertas especies de microorganismos son indetectables a través de este medio, por lo tanto, es preferible emplear en experimentos posteriores pruebas adicionales como la microscopía de fluorescencia (Gamalero *et al.*, 2003) o pruebas moleculares cuantitativas independientes de

cultivo. Adicionalmente, por la presencia universal de bacterias asociadas a plantas, será necesario definir también métodos que permitan su cuantificación y reducción, o eliminación. Aunque tanto esos métodos como otros grupos de microorganismos están por fuera del alcance de esta investigación, de la que no se tiene precedente en este tipo de pasturas.

Con base en la ineficacia relativa de los tratamientos probados aquí, es posible sugerir que las pruebas con estos hongos deben partir de niveles de inóculo ya presentes en el material vegetal. Una alternativa razonable es inducir diferencias en niveles de colonización inicial por endófitos a partir de combinaciones de tratamientos físico-químicos. Por ejemplo el uso de NaOCl al 5 % seguido por calor a 60°C en baño de agua por 10 minutos, redujo el porcentaje de colonización de hongos endófitos en cerca de 40 % sin ocasionar daños evidentes a la planta. Aunque los efectos podrían depender de la forma de distribución de calor en cada especie particular. Wali *et al.* (2011) eliminaron endófitos de semillas de *Festuca arundinacea*, a 56°C por 30 minutos, mientras que en *Poa alsodes* y *Achnatherum sibiricum* se eliminaron endófitos por tratamiento de semillas a 60°C durante 30 días (Kannadan & Rudgers, 2008; Li *et al.*, 2012), sin afectar la germinación.

Con fungicidas se encontró efecto significativo de Captan y Benomil en germinación y desarrollo de semillas, al disminuir en cerca de 50 % el porcentaje de germinación (Captan) y aumentar el número de raíces principales por bolsa (Benomil) (Figura 4, experimento IV), pero la desinfección interna de semillas es ineficiente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bayman *et al.* (2002); Gamboa *et al.* (2005) y Chen (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*.

Pero mas allá del sistema de cultivo adaptado para esta investigación, la detección de hongos endófitos en este pasto, así como la imposibilidad de erradicarlos tiene implicaciones para la realización de pruebas de re-inoculación de estos hongos y posiblemente otros microorganismos. Esto sugiere que en el pasto *B. decumbens*, bajo condiciones naturales, existe una relación innata planta-endófito como sucede en especies de *Vaccinium* (Rayner, 1929) o *Bouteloua* (Barrow *et al.*, 2004). De acuerdo con esos autores, no es posible obtener plantas libres de hongos endófitos por desinfección o remoción de la cubierta de las semillas, ya que estos hongos penetran profundamente el endospermo de semillas en reposo; por lo tanto, durante la germinación todos los tejidos que emergen son objeto de invasión por el micelio de dichos hongos. 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 en el material de propagación. Por ejemplo, un ejercicio simple de búsqueda en *Google*

Scholar utilizando los términos *fungal + septate + endophyte + plant + roots + anova* entre 2014 y 2015 indicó que de 89 artículos, apenas 7 indicaban claramente la verificación de colonización o no de hongos endófitos en los tratamientos control, lo que limita el alcance de conclusiones en este tipo de investigaciones.

En esta investigación no se usaron otros métodos de detección de hongos endófitos en semillas, ya que su presencia en ellas no garantiza la colonización posterior de raíces. Pero los argumentos arriba soportan la idea de que muchas pruebas en la literatura, que no verifican la presencia de endófitos originados desde el material de propagación, podrían presentar limitaciones en sus conclusiones acerca del papel de esos microorganismos en simbiosis con plantas. *B. decumbens* es una especie invasora bien adaptada a suelos de baja fertilidad y es ampliamente usada como forraje, aunque se considera perjudicial en algunos lugares del mundo (CABI, 2017). Sin embargo, se conoce poco sobre el papel de estos hongos endófitos en su adaptación ecológica. En otras especies se ha encontrado asociación específica entre tipos de endófitos y éxito reproductivo o distribución de especies o híbridos vegetales en nuevos ambientes. Igualmente se ha sugerido que puede presentarse hibridización entre endófitos, que explicaría su alta diversidad (Rodríguez *et al.*, 2009). En cualquier caso, por la importancia de esta especie vegetal, será necesario realizar investigaciones básicas y usar herramientas más sofisticadas, que permitan identificar el origen y funcionalidad de estas simbiosis.

Como recomendación, el tratamiento de semillas con calor, combinado con aplicación de fungicidas permitiría obtener plantas con poblaciones reducidas de endófitos. Sin embargo, los tiempos y dosis deberán determinarse para cada especie vegetal. No obstante para el caso de los fungicidas después de aplicarlos, será necesario determinar el efecto residual del fungicida en las plántulas a través del tiempo, ya que algunos fungicidas permanecen hasta 20 días en la planta (Proost, & Smit, 2013).

5. CONCLUSIÓN

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.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue desarrollada gracias al apoyo parcial de la 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 Uni-

versidad Nacional de Colombia 2013-2015, proyecto Hermes 19846. La revisión de dos jurados anónimos contribuyó a mejorar la versión original de este manuscrito.

Referencias

- Alarcón, A. & Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Lationoamericana*, 17(3), 179-191.
- Barney, D. (2003). Effects of light, surface sterilization, and fungicides on the germination of black huckleberry seeds. *Small Fruits Review*, 2(2), 73-80.
- Barrow, J. (2003). Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, 13(5), 239-247.
- Barrow, J.; Osuna, P. & Reyes, I. (2004). Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *Bouteloua eriopoda* Torr. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40(6), 608-612.
- Bayman, P.; Gonzalez, E.; Fumero, J. & Tremblay, R. (2002). Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. *Journal of Ecology*, 90(6), 1002-1008.
- Biondini, M. (1988). Carbon and nitrogen losses through root exudation by *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(4), 477-482.
- CABI (2017). Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. Disponible en: <http://www.cabi.org/isc>.
- Cheplick, G. (2011). Endosymbiosis and population differentiation in wild and cultivated *Lolium perenne* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 98(5), 829-838.
- Ernst, M.; Mendgen, K. & Wirsal, S. (2003). Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(7), 580-587.
- 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, M., Wen, S., Fetcher, N. & Bayman, P. (2005). Effects of fungicides on endophytic fungi and photosynthesis in seedlings of a tropical tree, *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 10(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), 201-208.
- Giovanetti, M. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 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 and Soil*, 201(2), 231-239.
- Heist, E.; Nesmith, W.; & Schardl, C. (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. *Journal of Environmental Quality*, 35(2), 590-598.
- Hepper, C. (1981). Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytologist*, 88(4), 641-647.
- Jumpponen, A. & Trappe, J. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *The New Phytologist*, 140(2), 295-310.
- Kannadan, S. & Rudgers, J. (2008). Endophyte symbiosis benefits a raregrass under low water availability. *Functional Ecology*, 22(4), 706-713.
- Kloeper, J. & Schroth, M. (1981). Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 71(6), 642-644.
- Knudson, L. (1929). Seed germination and growth of *Calluna vulgaris*. *New Phytologist*, 28(5), 369-376.
- Latch, G. & Christensen, M. (1982). Ryegrass endophyte, incidence, and control. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 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.
- Mergulhao, A.; Burity, H.; Tabosa, J.; Figueiredo, M. & Maia, L. (2001). Salt stress response of *Brachiaria* plants with and without inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agrochimica-Pisa*, 45(1/2), 24-31.
- Misaghi, I. & Donndelinger, C. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80(9), 808-811.

- Newsham, K.; Upson, R. & Read, D. (2009). Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology*, 2(1), 10-20.
- Porras, A.; Herrera, J.; Sinsabaugh, R.; Odenbach, K.; Lowrey, T. & Natvig, D. (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2805-2813.
- Proost, R. & Smit, D. (2013). Fungicide resistance management in corn, soybean, and wheat in Wisconsin. University of Wisconsin. [Fecha de consulta: Marzo de 2015]. Disponible en: <http://ipcm.wisc.edu/download/pubsPM/A3878FungicideResistance.pdf>. 1-8.
- Rasband, W. (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.
- Rayner, M. (1929). The biology of fungus infection in the genus *Vaccinium*. *Annals of Botany*, 43(169), 56-69.
- Redman, R.; Sheehan, K.; Stout, R.; Rodriguez, R. & Henson, J.(2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298(5598), 1581-1581.
- Rodriguez, R.; Redman, R. & Henson, J. (2004). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9(3), 261-272.
- Rodriguez, R.; Freeman, D.; McArthur, E.; Kim, Y. & Redman, R. (2009). Symbiotic regulation of plant growth, development and reproduction. *Communicative and Integrative Biology*, 2(2), 141-143.
- Sandnes, A. & Eldhuset, T. (2003). Soda glass beads as growth medium in plant cultivation experiments. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(5), 660-661.
- Sauer, D. & Burroughs, R. (1986). Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology*, 76(7), 745-749.
- Simons, M.; Van Der Bij, A.; Brand, I.; De Weger, L.; Wijffelman, C. & Lugtenberg, B. J. (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 9(7), 600-607.
- Tamayo, D. (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 (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Wyss, U. & Piche, Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 5004-5007.

- Wali, P.; Helander, M. & Saikkonen K. (2011). Manipulation of Epichlœe/Neotyphodium-endophyte infection in grasses: elimination of endophytes by heat treatment. *Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes. A Laboratory Manual, Part B: Fungi.*/Pirttilä, AM, Sorvari, S.(eds), 199-201.
- 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.