

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



**IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A LA MADERA DE *NOTHOFAGUS*
DOMBEYI Y *N. PUMILIO* Y SU BIOPROSPECCIÓN COMO AGENTES ÚTILES EN LA
PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y LA GENERACIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES.**

Trabajo de tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Mariano Damián Aquino

Directora: Dra. Maria Belén Pildain

Director: Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat

Año 2024

Agradecimientos

A Io y Elu, por todo su cariño, amor y comprensión, gracias por todo

A mi mamá, a Darío, a Diego, a Lauty, a Mari y Reny por estar siempre conmigo

A mi gran amiga la Gabi, otra etapa terminada juntos

A mis directores, Belén y Mario por la paciencia y sapiencia en todos estos años, gracias por querer seguir aguantantome unos años más

A todo el grupo del CIEFAP, institución que me vio crecer como profesional

A mis amigos de acá y allá, y a todas las personas que han formado parte de esto

Dedicada a Elu, la luz de mi vida

RESUMEN

Los hongos tienen un papel importante frente a los grandes retos globales de desarrollo sustentable, siendo herramientas potenciales para mejorar la eficiencia de los recursos, en la biodegradación de residuos, en la promoción y protección de cultivos agrícolas y como fuente de sustitutos renovables para los productos de los recursos fósiles. Existe un grupo importante de hongos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada para controlar biológicamente a patógenos y plagas. Mientras que otros tienen la capacidad de acumular cantidades significativas de lípidos, principalmente triglicéridos, lo que los agrupa dentro de los microorganismos oleaginosos. También, hongos asociados a la madera, incluyendo fitopatógenos, son conocidos por su capacidad para sintetizar enzimas relacionadas con la degradación vegetal, incluyendo proteínas hidrolíticas como lipasas. Las numerosas aplicaciones industriales de estos organismos y su metabolismo en el control de enfermedades, biocombustibles, aditivos alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con una importante actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales, etc. han estimulado el interés en el aislamiento y caracterización de hongos de diferentes ambientes. En este contexto, los bosques andino patagónicos constituyen una de las últimas reservas mundiales de bosques templados con poca alteración antrópica y valiosa biodiversidad, con gran potencial como fuente de nuevos organismos para desarrollos biotecnológicos. En este marco, el objetivo general de este trabajo fue analizar los hongos habitantes de los bosques andino patagónicos y algunos de sus roles relacionados con el crecimiento vegetal y la producción de lipasas y la síntesis de lípidos. Los objetivos específicos se desarrollaron en 3 ejes principales: 1) Aislar e identificar taxonómicamente hongos asociados a la madera de *Nothofagus dombeyi* y evaluar la capacidad de aislamientos seleccionados para inhibir agentes patógenos específicos como *Huntia decorticans*, promover la actividad biológica de *N. dombeyi* e inferir los mecanismos fúngicos involucrados en ensayos bajo condiciones controladas. 2) Identificar morfológica y molecularmente aislamientos del género *Umbelopsis* y evaluar su capacidad de sintetizar enzimas y/o compuestos relacionados con el metabolismo lipídico. 3) Analizar la actividad lipasa de cepas del género *Ophiostoma* asociadas a especies forestales del bosque andino patagónico y evaluar su capacidad para transformar compuestos extraíbles de la madera de *Nothofagus*.

En el primer objetivo específico, se aislaron e identificaron hongos presentes en el vástago de plantines de *N. dombeyi* bajo 4 diferentes condiciones: a) con deficiencia de riego (bajo contenido de humedad del suelo), b) con inoculación del patógeno *H. decorticans*, c) con

deficiencia de riego e inoculado con el patógeno, y d) tratamiento control en condiciones normales (sin limitación de agua y sin patógeno). Se obtuvieron 92 aislamientos, de los cuales 86 pudieron ser identificados a través de su morfología y por el análisis molecular. El 93 % correspondió a representantes del grupo de Ascomycota, 5% a representantes de Basidiomycota y el 2% restante a Mucoromycota, específicamente *Umbelopsis vinacea*. Sin embargo, no se pudo definir una relación entre la frecuencia y el rol ecológico de los hongos aislados y los estreses impuestos en el ensayo, siendo la morfología de las plantas influenciada por el efecto de los tratamientos y no por la diversidad de hongos presentes en cada uno de los tratamientos. Posteriormente se enfrentaron *in vitro* estos aislamientos contra *H. decorticans* resultando aislamientos de las especies *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. redolens* y *Pestalotiopsis biciliata* inhibidores del crecimiento de este patógeno. Además, se evaluó la capacidad de crecimiento de estos aislamientos en medios con potencial osmótico desfavorable. Los aislamientos de *H. decorticans* y *P. biciliata* fueron los más afectados, mientras que los aislamientos de las especies *F. oxysporum* y *F. redolens* resultaron más resistentes. Por otro lado, en ensayos de inhibición de crecimiento de *H. decorticans* en sobrenadantes de cultivo de los aislamientos seleccionados se observó una inhibición significativa del crecimiento del patógeno con el sobrenadante de *P. biciliata*.

Con respecto a las actividades del objetivo 2, se analizó la actividad metabólica de aislamientos de los bosques andino patagónicos pertenecientes al género *Umbelopsis* para la síntesis de lípidos y de la actividad lipasa. Los resultados mostraron que los aislamientos pertenecientes al complejo *Umbelopsis ramanniana*, particularmente CIEFAPcc 686 y LPSc 521, tienen un comportamiento diferencial en términos de sintetizar enzimas con actividad lipolítica. Dado que LPSc 521 fue aislado de Tierra del Fuego, la región más fría de Argentina, su incapacidad para sintetizar lipasas en Tween 20 y su capacidad para producir bajos niveles de lípidos saturados pueden estar relacionadas con la temperatura a la que crece el hongo en su hábitat natural, y también la actividad de sus enzimas.

El objetivo 3 de análisis de la actividad lipolítica extracelular de aislamientos patagónicos del género *Ophiostoma* involucró actividades de screening de actividad en medio sólido, con Tween 20 y Tween 80 como sustratos, y en medio líquido, detectando la actividad espectralmente utilizando dos sustratos: 1,2-O-dilaúril-racglicerol-3-glutárico-(6'-metilresorufina)-éster, utilizado en laboratorios clínicos para detectar la actividad de lipasa pancreática, y p-nitrofenilpalmitato ampliamente utilizado para detectar actividad en ensayos biológicos en general. Se demostró el potencial de aislamientos nativos de la Patagonia, como *Ophiostoma grandicarpum*, *O. nothofagi* y *O. patagonicum*, como productores de estas enzimas, junto con *O. piliferum* que es cosmopolita y ampliamente utilizado en la industria como productor de este tipo de enzimas. En términos de

estabilidad enzimática, se observó que las lipasas de los aislamientos estudiados son más estables a temperaturas más bajas, lo cual es una característica importante para su aplicación industrial en condiciones variadas. Finalmente, el análisis de los extractivos de la madera reveló cambios en la composición de ácidos grasos, sugiriendo la capacidad de las lipasas de *Ophiostoma* para degradar lípidos presentes en la madera de *Nothofagus*.

Este estudio demuestra el potencial biotecnológico de los hongos de los bosques andino patagónicos en diversas aplicaciones, como el control biológico de patógenos, la síntesis de lípidos y la producción de enzimas lipolíticas. Los resultados obtenidos destacan la capacidad de ciertos hongos, como *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Pestalotiopsis biciliata*, para inhibir el crecimiento de *Huntia decorticans*, un patógeno forestal endémico de los bosques andino patagónicos. Además, los aislamientos LPSc de *Umbelopsis ramanniana* y CIEFAPcc 475 de *Ophiostoma piliferum* mostraron ser prometedores en la síntesis de lípidos y en la producción de lipasas respectivamente. La estabilidad de estas enzimas a bajas temperaturas es particularmente relevante para procesos industriales en condiciones controladas, lo que refuerza el interés por seguir investigando los hongos nativos de estos ecosistemas únicos para futuras aplicaciones biotecnológicas y de sostenibilidad ambiental.

Palabras clave: *Umbelopsis*, *Ophiostoma*, lípidos fúngicos, lipasas fúngicas, ácidos grasos, *Huntia decorticans*, extractivos de la madera, potencial osmótico.

ABSTRACT

Fungi have an important role to play in the major global challenges of sustainable development, being potential tools for improving resource efficiency, in the biodegradation of waste, in the promotion and protection of agricultural crops and as a source of renewable substitutes for fossil resource products. There is an important group of fungi that exhibit antagonistic effects with other micro-organisms and this action can be exploited to biologically control pathogens and pests. Others have the ability to accumulate significant amounts of lipids, mainly triglycerides, which groups them within the oleaginous microorganisms. Also, wood-associated fungi, including phytopathogens, are known for their ability to synthesize enzymes related to plant degradation, including hydrolytic proteins such as lipases. The numerous industrial applications of these organisms and their metabolism in disease control, biofuels, food additives in taste modification, synthesis of esters with important antioxidant activity, hydrolysis of fats for detergent manufacture, wastewater treatment, etc. have stimulated interest in the isolation and characterization of fungi from different environments. In this context, the Andean-Patagonian forests constitute one of the world's last reserves of temperate forests with little anthropogenic disturbance and valuable biodiversity, with great potential as a source of new organisms for biotechnological developments. In this framework, the general objective of this work was to analyze the fungi inhabiting the Andean-Patagonian forests and some of their roles related to plant growth and lipase production and lipid synthesis. The specific objectives were developed in 3 main axes: 1) To isolate and taxonomically identify fungi associated with *Nothofagus dombeyi* wood and evaluate the ability of selected isolates to inhibit specific pathogens such as *Huntia decorticans*, to promote the biological activity of *N. dombeyi* and to infer the fungal mechanisms involved in assays under controlled conditions. 2) To morphologically and molecularly identify isolates of the genus *Umbelopsis* and evaluate their ability to synthesise enzymes and/or compounds related to lipid metabolism. 3) To analyse the lipase activity of strains of the genus *Ophiostoma* associated with forest species from the Patagonian Andean forest and to evaluate their capacity to transform extractable compounds from *Nothofagus* wood.

In the first specific objective, fungi present on the stem of *N. dombeyi* seedlings were isolated and identified under 4 different conditions: a) with irrigation deficiency (low soil moisture content), b) with inoculation of the pathogen *H. decorticans*, c) with irrigation deficiency and inoculated with the pathogen, and d) control treatment under normal conditions (without water limitation and without pathogen). Ninety-two isolates were obtained, of which 86 could be

identified through morphology and molecular analysis. Ninety-three percent corresponded to representatives of the Ascomycota group, 5% to representatives of Basidiomycota and the remaining 2% to Mucoromycota, specifically *Umbelopsis vinacea*. However, it was not possible to define a relationship between the frequency and ecological role of the isolated fungi and the stresses imposed in the trial, the morphology of the plants being influenced by the effect of the treatments and not by the diversity of fungi present in each of the treatments. Subsequently, these isolates were tested *in vitro* against *H. decorticans*, resulting in isolates of *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. redolens* and *Pestalotiopsis biciliata* species inhibiting the growth of this pathogen. In addition, the ability of these isolates to grow on media with unfavourable osmotic potential was evaluated. Isolates of *H. decorticans* and *P. biciliata* were the most affected, while isolates of *F. oxysporum* and *F. redolens* species were more resistant. On the other hand, in growth inhibition assays of *H. decorticans* in culture supernatants of the selected isolates, a significant inhibition of pathogen growth was observed with the supernatant of *P. biciliata*.

With regard to the activities of objective 2, the metabolic activity of isolates from the Andean-Patagonian forests belonging to the genus *Umbelopsis* was analyzed for lipid synthesis and lipase activity. The results showed that isolates belonging to the *Umbelopsis ramanniana* complex, particularly CIEFAPcc 686 and LPSc 521, have a differential behaviour in terms of synthesizing enzymes with lipolytic activity. Since LPSc 521 was isolated from Tierra del Fuego, the coldest region of Argentina, its inability to synthesise lipases in Tween 20 and its ability to produce low levels of saturated lipids may be related to the temperature at which the fungus grows in its natural habitat, and also the activity of its enzymes.

The objective 3 analysis of the extracellular lipolytic activity of Patagonian isolates of the genus *Ophiostoma* involved screening activities in solid medium, with Tween 20 and Tween 80 as substrates, and in liquid medium, detecting the activity spectrophotometrically using two substrates: 1,2-O-dilauryl-racglycerol-3-glutaric-(6'-methylresorufin)-ester, used in clinical laboratories to detect pancreatic lipase activity, and p-nitrophenylpalmitate widely used to detect activity in general biological assays. The potential of native Patagonian isolates, such as *Ophiostoma grandicarpum*, *O. nothofagi* and *O. patagonicum*, as producers of these enzymes was demonstrated, together with *O. piliferum* which is cosmopolitan and widely used in industry as a producer of these enzymes. In terms of enzyme stability, it was observed that the lipases of the isolates studied are more stable at lower temperatures, which is an important characteristic for their industrial application in varied conditions. Finally, analysis of wood extractives revealed changes in fatty acid composition, suggesting the ability of *Ophiostoma* lipases to degrade lipids present in *Nothofagus* wood.

This study demonstrates the biotechnological potential of fungi from Andean-Patagonian forests in various applications, such as biological control of pathogens, lipid synthesis and lipolytic enzyme production. The results obtained highlight the ability of certain fungi, such as *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Pestalotiopsis biciliata*, to inhibit the growth of *Huntia decorticans*, a forest pathogen endemic to Andean-Patagonian forests. In addition, LPSc isolates from *Umbelopsis ramanniana* and CIEFAPcc 475 from *Ophiostoma piliferum* showed promise in lipid synthesis and lipase production, respectively. The stability of these enzymes at low temperatures is particularly relevant for industrial processes under controlled conditions, which reinforces the interest to further investigate fungi native to these unique ecosystems for future biotechnological and environmental sustainability applications.

Key words: *Umbelopsis*, *Ophiostoma*, fungal lipids, fungal lipases, fatty acids, *Huntia decorticans*, wood extractives, osmotic potential.

INDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN.....	13
HONGOS HABITANTES DE LA MADERA.....	13
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS: LÍPIDOS Y LIPASAS.....	17
<i>Producción de lípidos.....</i>	<i>17</i>
<i>Producción de lipasas.....</i>	<i>19</i>
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
CAPÍTULO 1.....	24
HONGOS HABITANTES DE LA MADERA DE <i>NOTHOFAGUS DOMBEYI</i>	24
<i>Introducción.....</i>	<i>24</i>
<i>Materiales y métodos.....</i>	<i>28</i>
Plantines de <i>Nothofagus</i>	28
Obtención de los aislamientos fúngicos.....	29
Identificación molecular de los aislamientos.....	29
Análisis de interacción <i>in vitro</i> : confrontación de los aislamientos contra <i>H. decorticans</i>	30
Efecto de los sobrenadantes de cultivos de aislamientos seleccionados sobre el crecimiento de <i>H. decorticans</i>	31
Efecto del potencial hídrico sobre el crecimiento de los aislamientos antagonistas seleccionados y <i>H. decorticans</i>	32
Análisis estadístico.....	32
<i>Resultados.....</i>	<i>33</i>
Identificación de los aislamientos.....	33
Análisis de interacción <i>in vitro</i> : confrontación de los aislamientos contra <i>H. decorticans</i>	40
Efecto de los sobrenadantes de aislamientos antagonistas sobre el crecimiento de <i>H. decorticans</i>	43
Efecto del potencial hídrico en el crecimiento de los aislamientos antagonistas y <i>H. decorticans</i>	44
<i>Discusión.....</i>	<i>46</i>
Identificación de hongos y biodiversidad.....	46
Análisis de interacción <i>in vitro</i> y efecto de los sobrenadantes seleccionados en el crecimiento de <i>H. decorticans</i>	49

Efecto del potencial hídrico en el crecimiento de los aislamientos antagonistas y <i>H. decorticans</i>	52
<i>Conclusión</i>	53
CAPÍTULO 2	55
IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DEL GÉNERO <i>UMBELOPSIS</i> Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y LIPASAS.....	55
<i>Introducción</i>	55
<i>Materiales y métodos</i>	56
Aislamientos utilizados.....	56
Identificación morfológica.....	57
Identificación molecular.....	57
Análisis del crecimiento y producción de lípidos en medio sólido.....	59
Crecimiento de hongos y producción de lípidos en medio líquido.....	59
Análisis de lípidos totales en aislamientos seleccionados.....	59
Análisis de ácidos grasos de LPSc 521 con cromatografía gaseosa.....	60
Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular en medio sólido.....	60
Análisis del efecto de diferentes aditivos sobre la actividad lipasa en medio de cultivo líquido.....	61
Análisis estadístico de crecimiento, actividad de lipasa y producción de lípidos.....	62
<i>Resultados</i>	62
Identificación de los aislamientos.....	62
Identificación molecular.....	63
Análisis del crecimiento y producción de lípidos en medio sólido.....	66
Crecimiento del hongo y producción de lípidos en medio líquido.....	68
Análisis de lípidos totales en los aislamientos seleccionados.....	69
Análisis de ácidos grasos de LPSc 521 con cromatografía gaseosa.....	70
Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular en medio sólido.....	71
Análisis del efecto de diferentes aditivos sobre la actividad lipasa en medio de cultivo líquido.....	74
<i>Discusión</i>	77
Identificación de los aislamientos.....	77
Análisis de lípidos totales en los aislamientos seleccionados.....	78
Análisis de ácidos grasos de LPSc por cromatografía gaseosa.....	79
Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasas extracelular en medio sólido y en medio líquido utilizando diferentes aditivos.....	81

<i>Conclusiones</i>	84
CAPÍTULO 3	85
ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EXTRACELULAR DE AISLAMIENTOS PATAGÓNICOS DEL GÉNERO <i>OPHIOSTOMA</i>	85
<i>Introducción</i>	85
<i>Materiales y métodos</i>	87
Aislamientos de hongos utilizados.....	87
Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular en medio sólido.....	88
Evaluación de la actividad lipasa extracelular en medio líquido.....	89
Evaluación de la estabilidad térmica de la actividad lipolítica extracelular de cultivos seleccionados.....	90
Obtención de extraíbles liposolubles de la madera de <i>Nothofagus</i> y análisis de sus lípidos totales.....	90
Evaluación de la actividad lipasa extracelular de aislamientos seleccionados a baja temperatura estimando la producción de ácidos grasos libres en mezclas de reacción usando un extraíble lipofílico de madera de <i>Nothofagus</i> como fuente de sustratos enzimáticos.....	91
Análisis estadístico.....	91
<i>Resultados</i>	92
Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular.....	92
Análisis de la estabilidad térmica de la actividad lipolítica extracelular de cultivos seleccionados.....	94
Análisis de los lípidos totales de un extraíble liposoluble de la madera de <i>Nothofagus</i> y de los sobrenadantes de los aislamientos seleccionados.....	97
Evaluación de la actividad lipasa extracelular de aislamientos seleccionados a baja temperatura, estimando la producción de ácidos grasos libres en mezclas de reacción usando un extraíble lipofílico de madera de <i>Nothofagus</i> como fuentes de sustratos enzimáticos.....	98
<i>Discusión</i>	102
Análisis de la actividad enzimática.....	102
Determinación de los extractivos de la madera.....	105
<i>Conclusiones</i>	106
CONCLUSIONES GENERALES	108
BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN

Hongos habitantes de la madera

Los hongos son organismos eucariotas de gran relevancia en la investigación y desarrollo de metabolitos y enzimas con aplicaciones clínicas e industriales. En particular, los hongos que colonizan la madera se destacan significativamente por su capacidad para desarrollarse tanto en madera viva como muerta (Ottosson, 2013). Estos hongos desempeñan funciones cruciales en los ecosistemas, actuando por ejemplo como descomponedores principales de la materia orgánica. Al descomponer la madera, facilitan el reciclaje de nutrientes esenciales, promoviendo la fertilidad del suelo y la sostenibilidad de los ecosistemas forestales (Rayner & Boddy, 1988, Eastwood et al. 2011, Lindahl & Tunlid, 2015). Además de su papel en el ecosistema, son conocidos por su capacidad de producir una variedad de compuestos bioactivos, entre las cuales se incluyen enzimas como las celulasas y ligninasas, que tienen aplicaciones industriales en la bioconversión de biomasa y en la producción de biocombustibles (Bhat et al. 2000, Gupta et al. 2016, Bhatt et al. 2022). Los metabolitos y enzimas con propiedades antibióticas, antifúngicas y antioxidantes tienen un alto valor en diversos sectores industriales, como la producción de biocombustibles, la biorremediación, y la industria farmacéutica (Kirk & Farrel, 1987, Kusari et al. 2012, Singh et al. 2016, Joubert & Doty 2018). Los hongos asociados a la madera más estudiados son los patógenos y los formadores de micorrizas, no así los endófitos (Ottosson 2013). Estos últimos son un grupo ecológico diverso y polifilético que se encuentran en diferentes órganos de las plantas, desde los ecosistemas naturales hasta en los campos agrícolas (Arnold et al. 2003, Rodriguez et al. 2009, Kusari et al. 2013), y se definen como "organismos que en algún momento de su vida habitan en alguno de los órganos de la planta sin causar daño aparente al hospedante" (Petrini, 1991). Ampliando esta definición, se ha demostrado que la comunidad endofítica puede cumplir roles fundamentales en el funcionamiento de las plantas e influir en su aptitud a tal punto de ser indispensables para el desarrollo del hospedador (Harrison & Griffin, 2020), pudiendo actuar como antagonistas contra los patógenos del hospedador (Nair & Padmavathy, 2014) y, cuando el árbol muere, actuar como saprobios y aprovechar el material previamente colonizado (Korkama-Rajala et al. 2008). En ciertas condiciones, en cambio, pueden convertirse en patógenos y causar daños al hospedante (Hyde & Soyong, 2008, Ragazzi et al. 2003, Rodriguez & Redman 2008, Kusari et al. 2012).

El impacto de los hongos endófitos en los ecosistemas forestales, en comparación con el de hongos patógenos y simbiontes micorrízicos, es relativamente desconocido. La hipótesis del

"antagonismo equilibrado" (Schulz et al. 1999, Schulz & Boyle 2005) plantea que la colonización asintomática de un endófito en su huésped se debe a un delicado equilibrio entre los factores de virulencia del hongo y los mecanismos de defensa de la planta. Este equilibrio puede mantenerse mientras ninguno predomine, evitando así que el hongo cause enfermedad. Sin embargo, factores ambientales o intrínsecos pueden desestabilizar esta relación, transformando al endófito en un patógeno o causando su eliminación por las defensas de la planta (Fig 1) (Kusari et al. 2012). En determinadas circunstancias, pueden proteger a su planta hospedadora del ataque de patógenos, ya sea de manera directa o indirecta, mediante la generación de un amplio espectro de metabolitos y otras moléculas. Estas sustancias presentan actividades antifúngicas, antivirales, insecticidas y promotoras del crecimiento vegetal, entre otras (Schulz et al. 2002, Gunatilaka, 2006, Kusari et al. 2012). Un ejemplo, son los representantes del género *Umbelopsis*. Numerosos estudios reportan síntesis de metabolitos (Papanikolaou et al. 2007, Peng et al. 2011, Ruan et al. 2012, Huang et al. 2015, Khan et al. 2017, Kotogan et al. 2018), y su acción en la promoción del crecimiento vegetal a través de mecanismos directos y/o indirectos (Li et al. 2018, Zhao et al. 2021), incluyendo la activación de mecanismos en el hospedador tales como la producción o modificación de metabolitos específicos de la planta (Qin et al. 2018).

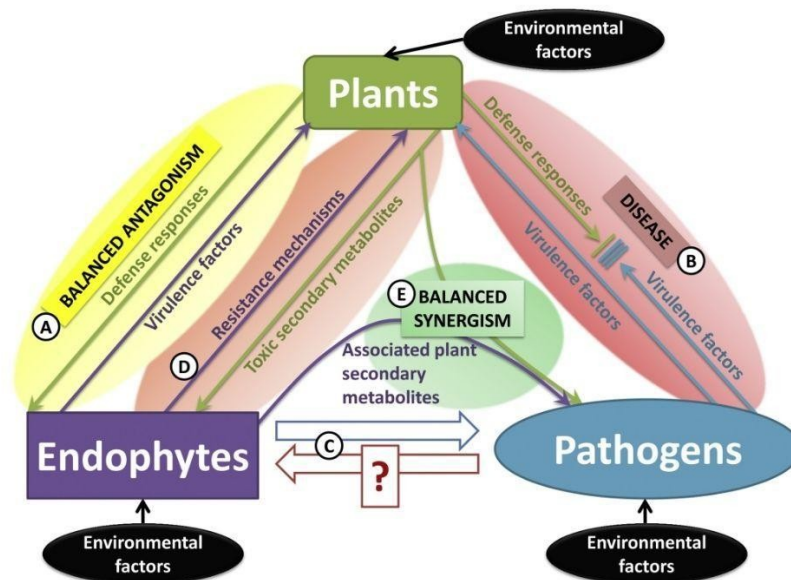


Fig 1. Esquema de la interacción entre las plantas hospedadoras y los habitantes de la madera. Esta relación es una relación sinérgica hongo-planta en donde factores ambientales afectan el comportamiento que podrían tener entre sí. Los balances que se dan entre la planta con su

mecanismo de defensa frente a los patógenos y al considerar a los endófitos como parte de este mecanismo. A su vez, la planta y el endófito tienen restringida la capacidad de atacarse entre ellos mismos. Extraído de Kusari et al. (2012)

La gran riqueza natural de Argentina se sustenta en gran parte en su recurso forestal nativo, el que con más de 30 millones de hectáreas, presenta una importante diversidad biológica, en su mayoría endémica (Sanmartín et al. 2004, Tedersoo et al. 2014). Dentro de este marco, los bosques andino patagónicos (Fig 2) constituyen una de las últimas reservas mundiales de bosques templados con poca alteración antrópica y valiosa diversidad vegetal y animal, con una extensión de aproximadamente 3 millones de hectáreas (CIEFAP - MADyS, 2016). De los géneros presentes sólo 20 son arbóreos, y el 90 por ciento de la superficie ocupada por éstos corresponde al género *Nothofagus* o “falsas hayas del sur” (CIEFAP - MADyS, 2016). Estudios previos realizados por el Área de Fitopatología y Microbiología Aplicada de CIEFAP en los bosques de *Nothofagus*, han permitido obtener una colección importante de hongos patógenos forestales como también de especies endofíticas, degradadores (habitantes comunes de la madera) asociados a fuste y raíz (Fig 3), y otros con potenciales roles ecológicos a analizar como por ejemplo el de promotores de crecimiento y biocontroladores (Butt et al. 2001, Rajchenberg 2006, Pildain et al. 2009, de Errasti et al. 2015; Olivera et al. 2016, Molina et al. 2020).

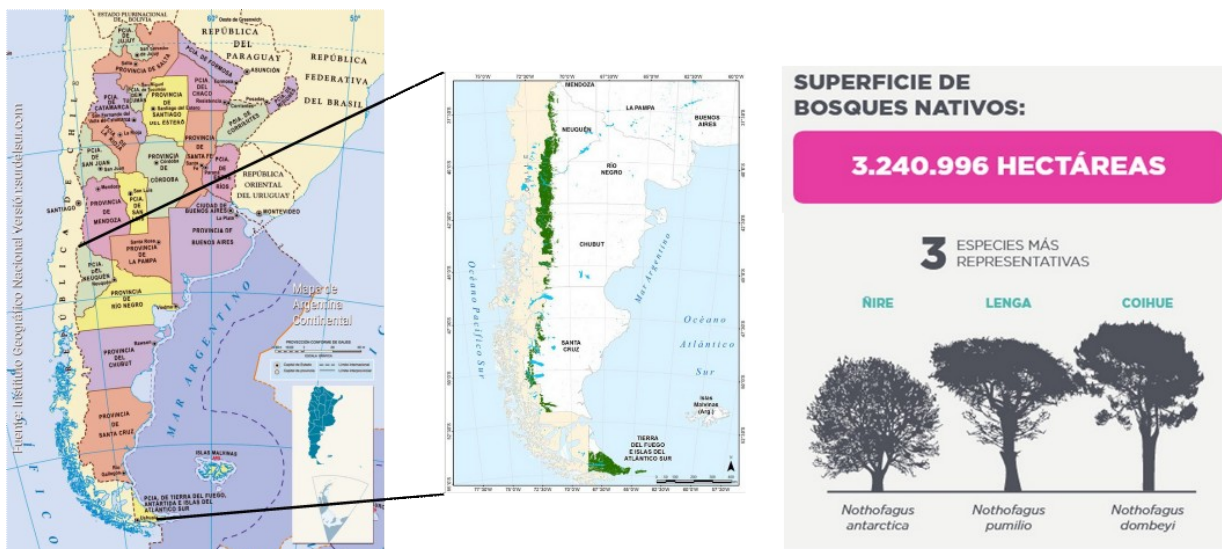


Fig 2. Referencia sobre los bosques andino patagónicos.



Fig 3. A) Bosque de *Nothofagus dombeyi*. Representantes de hongos con diferentes roles ecológicos: B) *Ramaria patagónica* (micorrizico), C) *Cyttaria harii* (parasítico), D) *Pleurotus ostreatus* (degradador), E) *Huntiella decorticans* (patógeno).

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada para controlar biológicamente a patógenos y plagas. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos entre los que se encuentran antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Adeleke et al. 2022, Lalremruati et al. 2024). Esto puede ser una alternativa al control de microorganismos que generan enfermedades a las plantas, que tradicionalmente se ha realizado con productos químicos, mitigando así la generación de estos compuestos que aceleran el calentamiento global y ocasionan disturbios en los ecosistemas (Fravel, 2005). Si los cultivos son afectados por patógenos, si se necesitan biofertilizantes eco-compatibles para aumentar y mejorar la productividad vegetal, o si se requieren nuevas enzimas y metabolitos útiles para las industrias agroforestal, de salud y alimentaria, es fundamental desarrollar líneas de investigación que satisfagan estas necesidades (Savary et al. 2019, Devi et al. 2020).

En este marco, los proyectos de investigación interdisciplinarios y con un fuerte componente de integración entre investigación y transferencia pueden contribuir significativamente a este modelo (Bruce et al. 2004). Las complejas redes creadas por microorganismos y la bioprospección son temas de investigación muy importantes en la actualidad, dada la potencialidad

como fuente de diversidad para desarrollos biotecnológicos a partir de organismos o procesos y mecanismos que llevan adelante. Estos criterios, sumados a la innovación tecnológica y agregado de valor de los recursos regionales, se adecúan a una estrategia bioeconómica de desarrollo mientras que impulsan acciones para adelantarse a situaciones de cambio climático que obliga a encontrar nuevas alternativas a una velocidad como nunca antes (Allen et al. 2010, Trabelsi & Mhandi, 2013)

Producción de compuestos específicos: Lípidos y Lipasas

Producción de lípidos

Diferentes microorganismos tienen la capacidad de acumular cantidades significativas de lípidos, principalmente triglicéridos, bajo ciertas condiciones de cultivo (Ratledge 2004, Santek et al. 2018). Por esta capacidad se los conoce como microorganismos oleaginosos y pueden ser algas, bacterias y hongos (Chatzifragkou et al. 2011, Santek et al. 2018). Estos organismos producen diferentes tipos de contenido lipídico, como se muestra en la tabla 1, datos extraídos y modificados de Meng et al. (2009). Dependiendo del perfil de ácidos grasos, estos organismos pueden ser utilizados como materia prima para la producción de biodiesel o para productos nutraceuticos, entre otros usos (Patel et al. 2020). Por ejemplo, los ácidos grasos de cadena ramificada y los ácidos grasos hidroxilados se encuentran en los lípidos bacterianos (Ratledge, 1994, Subramanian et al. 2010). Mientras que los lípidos de algas exhiben una proporción excepcionalmente alta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés) asociados con lípidos polares (Radwan, 1991). Los ácidos grasos de los hongos son similares a los de los aceites vegetales, predominando los ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico, con los ácidos grasos de cadena corta (C10-C14), PUFA y ácidos grasos hidroxilados (Ratledge, 1994). El género *Umbelopsis* ha sido objeto de numerosos estudios debido a su eficiencia en la acumulación de lípidos bajo condiciones de cultivo específicas. Por ejemplo, *Umbelopsis isabellina* se utiliza frecuentemente como modelo en investigaciones sobre la acumulación de lípidos, ya que puede convertir diversos sustratos en aceites de manera muy eficiente (Papanikolaou & Aggelis 2019, Dzurendova et al. 2020, Zhao et al. 2021). La producción de biocombustibles a partir de estos hongos ofrece una alternativa sostenible a los combustibles fósiles, aprovechando residuos orgánicos y subproductos industriales como sustratos de cultivo (Langseter et al. 2021)

Tabla 1. Ejemplo de contenidos lipídicos en diferentes tipos de microorganismos (Meng et al. 2009).

Microorganismo	Contenido (% peso seco)	Microorganismo	Contenido (% peso seco)
Microalgas		Levaduras	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotarula glutinis</i>	72
Bacterias		Hongos filamentosos	
<i>Arthrobacter sp.</i>	> 40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i> *	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i> *	66

* Actualmente estos organismos pertenecen al género *Umbelopsis*, renombrados como *Umbelopsis isabellina* y *Umbelopsis vinacea*.

Como es bien sabido, la acumulación de lípidos en la biomasa fúngica depende de las condiciones de cultivo, incluidos los valores de pH y temperatura, así como de la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno (Ochsenreither et al. 2016). Según Murphy (1991), tener una cantidad de lípidos totales superior al 39% de contenido de micelio seco (más del 25% p/p) permite que un aislamiento fúngico se califique como oleaginoso. El ciclo de vida de los microorganismos oleaginosos que crecen en medios de alta relación carbono/nitrógeno (C/N) se caracteriza por tres fases fisiológicas distintas: la fase de crecimiento, la fase de lipogénesis y la fase de renovación de lípidos de reserva (Fig 4) (Akpınar-Bayizit, 2014). Durante la fase de crecimiento, en la que todos los nutrientes se encuentran en exceso en el entorno de crecimiento, los microorganismos oleaginosos convierten la fuente de carbono en masa celular, rica en proteínas y polisacáridos, mientras que se van sintetizando cantidades restringidas de lípidos, principalmente lípidos polares como fosfolípidos y glicolípidos que son esenciales para la construcción de las membranas celulares. Después de la fase de crecimiento, se produce una acumulación de lípidos de novo durante la fase de lipogénesis. El exceso de carbono y el agotamiento de al menos un nutriente esencial, generalmente nitrógeno (pero también sulfato, fosfato o magnesio), en el medio de crecimiento son necesarios para desencadenar el inicio de la fase oleaginoso. En condiciones de limitación de nitrógeno, la proliferación celular se interrumpe, pero las células oleaginosas continúan asimilando la fuente de carbono produciendo lípidos de almacenamiento, principalmente triglicéridos. La alta tasa de absorción de la fuente de carbono da como resultado una mayor relación C/N en las células, que es un factor importante relacionado con la lipogénesis (Ratledge 2004, Akpınar-Bayizit 2014)

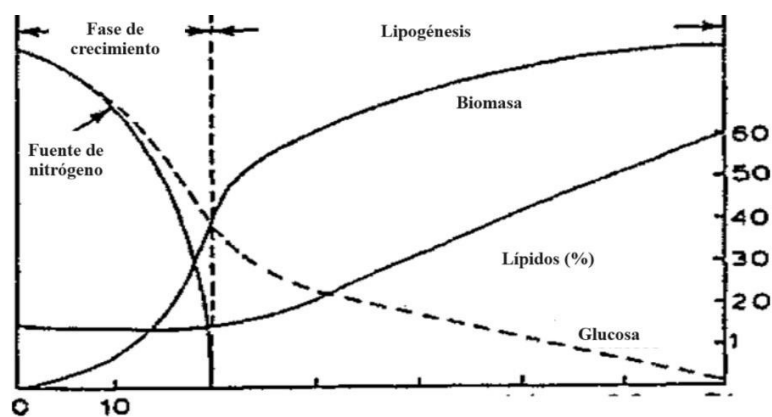


Fig 4. Esquema de las 3 fases fisiológicas de los hongos oleaginosos. Extraído y modificado de Akpinar-Bayizit, (2014)

Aunque se sugiere que la producción de lípidos celulares por hongos oleaginosos es valiosa para diferentes procesos biotecnológicos, como la industria del biodiesel, los procesos industriales todavía se limitan a la producción únicamente de aceites de ácidos grasos poliinsaturados de alto valor, como los ácidos γ linoleico y araquidónico. (Dzurendova et al. 2020). En un análisis tecnoeconómico de la producción de biodiesel a partir de lípidos microbianos, se encontró que la glucosa utilizada como fuente de carbono podría representar el 80% del costo (Koutinas et al. 2014). Las fuentes de carbono de bajo costo, como los residuos agrícolas y forestales, podrían ser una alternativa sostenible a la glucosa (Gardeli et al. 2017; Economou et al. 2011; Zheng et al. 2012; Patel et al. 2016). Esto es importante por que la determinación de parámetros de crecimiento óptimos para la máxima producción de lípidos y la diferenciación de ácidos grasos en diferentes condiciones podría ser clave para obtener mejores rendimientos utilizando como sustrato los mismos componentes de los cuales fueron aislados los hongos (Jin et al. 2014, Valdés et al. 2020)

Producción de lipasas

Diferentes hongos asociados a la madera, incluyendo fitopatógenos, son conocidos por su capacidad para sintetizar diferentes enzimas relacionadas con la degradación vegetal, incluyendo proteínas oxidativas e hidrolíticas como celulasas y lipasas (Félix *et al.* 2018). Las lipasas son enzimas que hidrolizan los acilglicérols en ácidos grasos y glicerol y participan en reacciones de esterificación y transesterificación (Fig 3). En general, son triacilglicérol acil hidrolasas (EC 3.1.1.3), con amplia especificidad de sustrato que catalizan la degradación de los triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Beisson *et al.* 2000, Joseph *et al.* 2008, Kanmani *et al.* 2015) (Fig 5). Las numerosas aplicaciones industriales de estas enzimas (ej. aditivos

alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con una importante actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales, etc.) han estimulado el interés en el aislamiento de nuevas lipasas a partir de fuentes microbiológicas y se han concentrado grandes esfuerzos para mejorar el rendimiento en aplicaciones industriales.

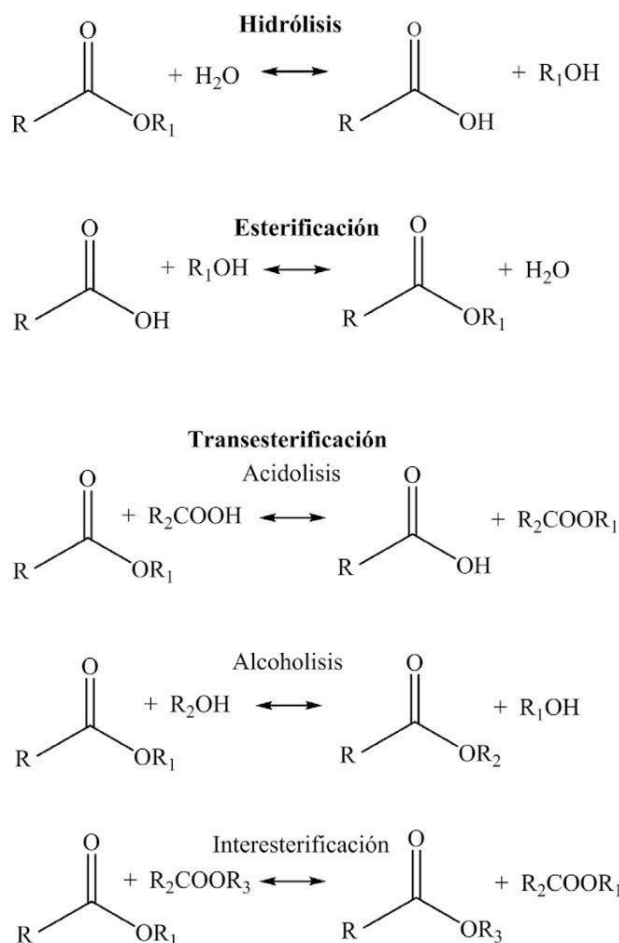


Fig 5. Reacciones catalizadas por lipasas. De arriba hacia abajo, hidrólisis y esterificación, reacciones de transesterificación: acidólisis, alcoholisis e interesterificación.

Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas son: su estabilidad en disolventes orgánicos, no requerir cofactores, poseer una amplia especificidad de sustrato y exhibir una alta enantioselectividad (Mehta *et al.* 2017). De hecho, son las enzimas microbianas más usadas en química orgánica en reacciones de síntesis y el tercer grupo de proteínas más comercializado, tras las proteasas y carbohidrolasas (Reetz 2002, Brahmachari, 2023). Cerca del 75% de las enzimas son comercializadas por tres grandes compañías: Novozymes, Dupont (Danisco) y Roche (Li et al. 2012). Las enzimas fúngicas son de naturaleza extracelular y se pueden extraer fácilmente,

lo que reduce significativamente los costos y hace que esta fuente sea preferible a las bacterias. Debido a estas características, estas hidrolasas se han utilizado en muchos campos, como la tecnología de alimentos, la industria de detergentes, las ciencias biomédicas y químicas, la síntesis de compuestos ópticamente activos y la modificación de lípidos (Gupta et al. 2016).

Los hongos Ofiostomatoides (grupo con morfología, historia taxonómica y ecológica similares) son un grupo polifilético con morfología convergente, que reflejan su adaptación a la dispersión por artrópodos (De Beer et al. 2016). El orden Ophiostomatales incluye siete linajes bien sustentados, representados por los siguientes géneros: *Aureovirgo*, *Ceratocystiopsis*, *Fragosphaeria*, *Graphilbum*, *Hawksworthiomyces*, *Raffaelea s. stricto* y *Sporothrix*. Dos grupos principales adicionales, para los cuales la monofilia no está bien respaldada, son *Leptographium s. lato* y *Ophiostoma s. lato* (Jankowiak et al. 2019). El género *Ophiostoma* incluye especies asociadas a plantas con diversos grados de patogenicidad (Six & Wingfield 2011, de Errasti, 2016). La mayoría de los representantes de este género se consideran no patógenos, especialmente en su área de distribución endémica, donde han coevolucionado con sus especies de árboles hospedantes, y son los principales responsables de causar manchas azules en la albura recién expuesta (Wingfield et al. 2017). Estas manchas se generan por la coloración de las hifas que penetran profundamente en la madera recién cortada, pudiendo ser estas gris azuladas, ocasionalmente negras, verdes, violetas o rosadas y más raramente marrones (Fig 6) (Yagodnik, 1997).

Fig 6. Mancha en rodal de *Pinus ponderosa* (izquierda) y *Nothofagus dombeyi* (de Errasti 2016)



Los hongos del género *Ophiostoma* no adquieren nutrientes a partir de componentes estructurales de madera, como son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, que normalmente representan más del 90% del peso seco de la madera, sino que los obtienen de los compuestos no

estructurales. Estos compuestos de la madera se encuentran en el citoplasma de las células del parénquima, la luz de las traqueidas y los vasos, y en algunas estructuras especiales como los canales resiníferos. Se pueden clasificar además en dos grupos: a) sustancias hidrófilas, como proteínas, aminoácidos, almidón, azúcares solubles y minerales, y b) sustancias lipófilas que son los llamados extractivos de la madera, resina o brea. La mayoría de la madera contiene del 2% al 6% de extractos de madera, que incluyen una variedad de lípidos, como glicéridos, ácidos grasos, ácidos resínicos, esteroides, ésteres de esteroides y ceras. En este ámbito se encuentra el Cartapip™, una cepa albina de *Ophiostoma piliferum*, que consigue reducir en un 40% el contenido de la fracción lipídica en madera de pino (Farrell et al. 1993). El Cartapip™ es efectivo en pastas mecánicas de maderas de gimnospermas con alto contenido en triglicéridos, pero no lo es para la degradación de esteroides libres y esterificados, que son los lípidos mayoritarios en otras maderas, como el eucalipto (Gutiérrez et al. 1999). También se han descrito otras enzimas para la degradación de ésteres de esteroides, como la esteroil esterasa aislada del hongo ascomiceto *Ophiostoma piceae*, que es capaz de hidrolizar simultáneamente tanto los ésteres de esteroides como los triglicéridos en pastas de celulosa (Calero-Rueda et al. 2004).

En este contexto, y sobre la base que estudios previos han permitido conocer la biodiversidad fúngica en bosques de *N. dombeyi* y *N. pumilio* (Rajchenberg 2006, Rajchenberg et al. 2015, Pildain et al. 2009, Pildain et al. 2010), la bioprospección de hongos con diferentes roles que pueden ser de utilidad en el desarrollo de estrategias sustentables es un tópico de vigente interés, a fin de lograr la conservación y protección de recursos naturales, a la vez de generar alternativas eco amigables de producción vegetal, control de fitopatógenos y la producción de biodiesel de tercera generación (Keswani et al. 2014, Sharma et al. 2016, Hyde et al. 2019, Shah et al. 2020).

OBJETIVO GENERAL

- Analizar los hongos habitantes de los bosques andino patagónicos y algunos de sus roles relacionados con el crecimiento vegetal y la producción de lipasas y la síntesis de lípidos.

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar taxonómicamente hongos asociados a la madera de *N. dombeyi* y evaluar la capacidad de aislamientos seleccionados para inhibir agentes patógenos específicos como *Huntia decorticans*, promover la actividad biológica de *N. dombeyi* e inferir los mecanismos fúngicos involucrados en estos procesos en ensayos bajo condiciones controladas.
2. Identificar morfológica y molecularmente aislamientos del género *Umbelopsis* y evaluar su capacidad de sintetizar enzimas y/o sustratos relacionados con el metabolismo lipídico
3. Analizar la actividad lipasa de cepas del género *Ophiostoma* asociadas a especies forestales del bosque andino patagónico y evaluar su capacidad para transformar extraíbles de la madera de *Nothofagus* y liberar ácidos grasos específicos

CAPÍTULO 1

Hongos habitantes de la madera de *Nothofagus dombeyi*

Introducción

Existe una diversidad compleja y aún poco conocida de microorganismos asociados a las plantas que impactan su estado físico, salud y nutrición de manera tanto positiva como negativa a través de dinámicas complejas (Kusari et al. 2012). Las plantas en la naturaleza están colonizadas por una rica diversidad de microorganismos que forman comunidades microbianas, de los cuales se sabe que muchos miembros promueven su crecimiento y salud (Hacquard et al. 2017). La estructura de esta comunidad microbiana (diversidad de especies, riqueza y abundancia relativa) es dinámica y está influenciada por factores abióticos y bióticos (Giordano et al. 2009, Molina et al. 2020). Asimismo, el fenómeno del cambio climático global, con aumentos de temperatura y disminución de la disponibilidad de agua, desencadena una modificación en la biodiversidad potencialmente nociva para la planta, que puede provocar una alteración de su crecimiento o desarrollo. Las interrelaciones entre factores bióticos y abióticos hacen que la decadencia de los bosques sea un fenómeno complejo de estudiar (Manion 2003). De acuerdo a Schulz & Boyle (2005), las interacciones hongo-planta huésped comprenden un equilibrio de antagonismo donde el endófito muestra una virulencia controlada, mientras que el huésped restringe la incitación de enfermedades por parte del endófito. Durante el largo período de coexistencia y procesos evolutivos, se han establecido diferentes relaciones entre los hongos endófitos y sus plantas hospedantes a través de una interacción hongo-hospedador particular reconocida como un continuo de mutualismo, antagonismo, y neutralismo (Jia et al. 2016). En vista a esta asociación estrecha con las plantas, es razonable esperar que los hongos endófitos contribuyan a la aptitud ecológica de sus plantas hospedantes para responder al cambio climático. Existen numerosos estudios que indican que las asociaciones y tasas de colonización de hongos endófitos son diferentes dependiendo del tejido vegetal colonizado, variando entre la corteza, el tallo y las hojas (Kumar & Hike 2004, Durán et al. 2005, Sun et al 2008), así como también del estado fenológico de la planta. Las plántulas, en sus primeras etapas de desarrollo, son particularmente vulnerables a los cambios ambientales y a las tensiones abióticas. La colonización por hongos endófitos en este estadio puede proporcionarles una ventaja significativa al mejorar su capacidad para tolerar condiciones adversas, tales como la sequía, el calor y la salinidad (Rodríguez et al. 2008, Ali et al. 2018). La diversidad de hongos

endófitos en una planta puede influir en la magnitud de esta tolerancia. La relación entre la diversidad de hongos endófitos y la capacidad de las plántulas para enfrentar factores ambientales adversos puede ser entendida como un mecanismo de co-adaptación evolutiva (Rodríguez & Redman 2008, Rodríguez et al. 2009). Los endófitos, a través de sus interacciones con las plantas, modulan diversas respuestas fisiológicas y bioquímicas en sus hospedantes (Mandyam & Jumpponen 2005). La presencia de una mayor diversidad de endófitos puede traducirse en una gama más amplia de respuestas adaptativas, permitiendo a las plántulas optimizar su crecimiento y supervivencia bajo condiciones ambientales fluctuantes (Arnold & Lutzoni 2007). Toda la evidencia muestra hoy que los hongos desempeñan importantes funciones beneficiosas en el desarrollo y la fisiología de la planta huésped, incluida mayor tolerancia al estrés, mayor crecimiento de sus raíces y el suministro de nutrientes y agua (Wani et al. 2015).

Entre los hongos endófitos asociados a diferentes tejidos de plantas leñosas se encuentran representantes de la familia Ceratocystidaceae (Microascales, Sordariomycetes) que incluye muchos patógenos importantes y agentes de mancha azul de la madera a nivel mundial (Wingfield et al. 1993; Roux y Wingfield 2009; De Beer et al. 2016). El género *Huntia*, perteneciente a esta familia, incluye al menos 20 especies en una amplia gama de huéspedes, con una distribución cosmopolita (Van Wyk et al. 2006, De Beer et al. 2016, De Errasti et al. 2015). *Huntia decorticans* de Errasti, Z.W. de Beer & Jol. (Ceratocystidaceae) es un patógeno endémico del bosque andino patagónico que causa marchitez y pudrición en árboles sanos, produciendo lesiones graves (cancros) en árboles de *Nothofagus* en Argentina (De Errasti et al. 2015). En la Fig 7 se presenta la infección del patógeno en *Nothofagus dombeyi*.



Fig 7. A la izquierda, plantín de *Nothofagus dombeyi*, y a la derecha, sección longitudinal del leño con el síntoma (necrosis) causado por *Huntiella decorticans*.

Las técnicas de biocontrol emplean mecanismos que interrumpen ciertas etapas de las enfermedades o del ciclo de vida de los patógenos, intentando, en principio, evitar las infecciones; o reducir la colonización de los tejidos del huésped, disminuyendo la esporulación y limitando la supervivencia del patógeno (Grondona et al. 1997, Vinale et al. 2008, Bautista-Rosales et al. 2013, Martínez-Alvarez et al. 2015). El control biológico propone el uso de organismos antagonistas para controlar microorganismos patógenos y reducir la carga de inóculo que promueva el desarrollo de enfermedades (Stangarlin et al. 2011).

El control biológico se basa en la capacidad de ciertos organismos para inhibir el crecimiento o la actividad de otros mediante diversos mecanismos. Uno de los principales mecanismos es el antagonismo, que inhibe a los organismos fitopatógenos mediante la secreción de sustancias químicas que interrumpen el ciclo de vida del microorganismo objetivo. Además del antagonismo, el control biológico incluye otras estrategias, como el micoparasitismo, donde los organismos de control biológico atacan y parasitan directamente a los patógenos. Otra estrategia es la generación de enzimas líticas y/o antibióticos, que degradan las estructuras celulares de los patógenos, impidiendo su proliferación. La estimulación de las defensas de las plantas es otra táctica importante, ya que fortalece las barreras naturales del huésped contra los ataques patógenos. Además, los agentes de biocontrol pueden competir eficazmente por recursos, limitando el acceso

de los patógenos a los nutrientes esenciales y al espacio necesario para su crecimiento (De Silva et al. 2019).

Como se ha mencionado, la importancia de los hongos asociados a las plantas para su aptitud, salud y nutrición es universalmente reconocida (Vandenkoornhuyse et al. 2015). Sin embargo, el cambio climático global, caracterizado por el aumento de las temperaturas y la consecuente evaporación, está afectando profundamente los ecosistemas, generando un impacto negativo en las plantas y su microbioma, lo que resulta en alteraciones significativas en su crecimiento y desarrollo (Fontana et al. 2021). Uno de los problemas más críticos derivados de este cambio es la sequía, ya que la disminución del contenido de agua en el suelo está afectando vastas regiones del mundo, exacerbando la escasez hídrica (Le Houerou, 1996). En este contexto, los hongos endófitos han demostrado ser aliados fundamentales para mitigar los efectos adversos de la sequía. Estos microorganismos pueden desencadenar diversos mecanismos de protección en las plantas, ayudándolas a enfrentar desórdenes tanto bióticos como abióticos, incluidos los periodos prolongados de sequía (Drigo et al. 2008). Entre los mecanismos que activan se incluyen la mejora en la eficiencia del uso del agua, la regulación del crecimiento de raíces y la producción de compuestos que incrementan la resistencia al estrés hídrico (Chadha et al. 2015). A pesar de sus beneficios conocidos, el cambio climático también puede afectar negativamente a estos hongos, alterando su capacidad para colonizar las plantas y expresar sus propiedades benéficas en condiciones extremas. La falta de agua y las temperaturas elevadas podrían reducir la eficacia de estas interacciones, lo que representa un desafío adicional en la lucha contra los efectos del cambio climático (Compant et al. 2009, Terhonen et al. 2019). Aún es necesario un mayor entendimiento sobre cómo las comunidades microbianas asociadas a las plantas son influenciadas directa o indirectamente por estas alteraciones ambientales, y cómo esto impacta en el rendimiento de las plantas y en el funcionamiento general del ecosistema (Chadha et al. 2015).

Tomando como base un contexto de sequía y la influencia de patógenos, este capítulo tiene como objetivo caracterizar los hongos asociados al tejido vascular de plantines de *Nothofagus dombeyi* bajo condiciones de deficiencia hídrica y en presencia de *Huntia decorticans* y analizar su capacidad para inhibir *in vitro* el crecimiento del patógeno.

Materiales y métodos

Plantines de *Nothofagus*

Se utilizaron 48 plantines de *Nothofagus dombeyi* de 2 años de edad, distribuidos en 4 tratamientos (Fig 8): 1) riego normal y sin patógeno (control), 2) con limitación de riego y sin patógeno, 3) riego normal y con inoculación del patógeno *Huntia decorticans*, 4) con limitación de riego y con el patógeno *Huntia decorticans*. Cada tratamiento estuvo compuesto por dos lotes de 6 plantines distribuidos al azar. Las inoculaciones con *Huntia decorticans* se realizaron a nivel del tallo, entre el cuello de la raíz y las primeras ramas, previamente desinfectando superficialmente la zona de inoculación con alcohol al 70%. La corteza se abrió con un bisturí esterilizado al flameado, exponiendo el floema, y luego se insertó en la herida generada, el inóculo de medio colonizado con micelio, en estrecho contacto con el floema. Se introdujo la corteza en su posición original y se cubrió la zona inoculada con gasa húmeda estéril, papel de aluminio y cinta adhesiva. Esta actividad se realizó en colaboración con personal del área de Ecología de Ecosistemas Terrestres del CIEFAP, siendo parte de los datos obtenidos reportados en Masera et al. (2023). En la Tabla 2 se presentan los datos que se utilizaron como base para el análisis de la relación del crecimiento de los plantines en las diferentes condiciones con la diversidad fúngica obtenida en este trabajo.

Tabla 2. Parámetros fisiológicos para cada uno de los tratamientos. Se presenta el valor medio $\pm$ desvío estándar.

	altura del tallo (h)	Largo de raíz (lr)	Altura total (Ht)	Diámetro del tallo (dac)	Supervivencia (sup)
Trat 1	60.99 $\pm$ 8.29	32.68 $\pm$ 7.62 b	93.68 $\pm$ 7.85 b	1.79 $\pm$ 0.70 b	100 b
Trat 2	56.07 $\pm$ 12.90	25.19 $\pm$ 4.63 a	81.26 $\pm$ 12.35 a	0.19 $\pm$ 0.30 a	66.67 ab
Trat 3	62.18 $\pm$ 11.34	31.58 $\pm$ 6.91 b	93.77 $\pm$ 15.99 b	2.02 $\pm$ 0.79 b	91.67 ab
Trat 4	53.90 $\pm$ 13.00	21.83 $\pm$ 4.61 a	75.73 $\pm$ 16.99 a	-0.24 $\pm$ 0.50 a	0 a

Abreviaturas: Trat 1: Tratamiento 1 (riego normal y sin *H. decorticans*); Trat 2: Tratamiento 2 (con déficit hídrico y sin *H. decorticans*); Trat 3, Tratamiento 3 (riego normal y con *H. decorticans*); Trat 4: Tratamiento 4 (con déficit hídrico y con *H. decorticans*).

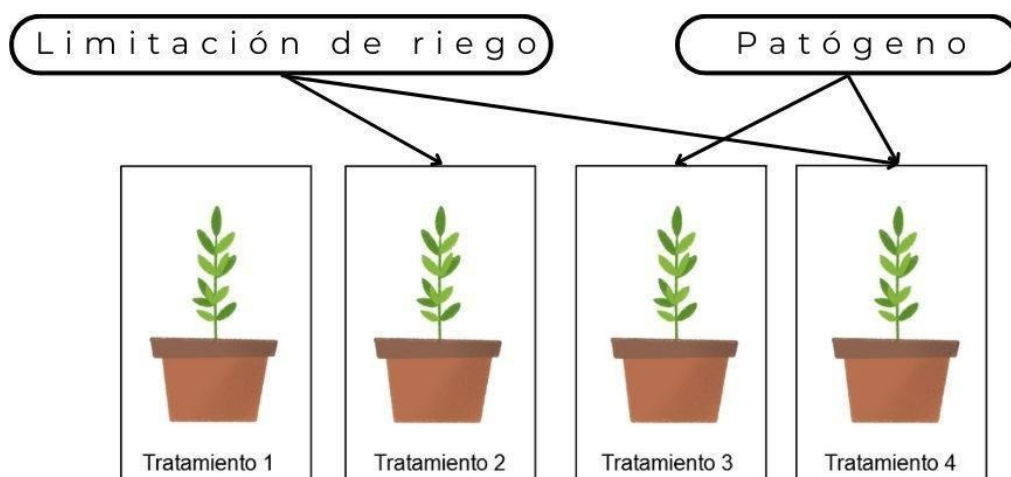


Fig 8. Esquema general de los plantines con los tratamientos bajo las diferentes condiciones.

Obtención de los aislamientos fúngicos.

Una vez que se retiraron las plantines de los contenedores, se tomaron muestras de tejido vascular de los plantines de 1 cm de largo, a una distancia de 5 cm por encima del cuello de la raíz por planta de cada tratamiento. Las muestras de material vegetal se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en etanol al 96% (durante 1 min), en hipoclorito de sodio al 10% (3 min), en etanol al 70% (durante 30 segundos) y finalmente en agua destilada estéril (1 min) para eliminar posibles restos de los desinfectantes. Las muestras se colocaron en papel de filtro estéril, antes de cortarlas en trozos pequeños para sembrarlas en agar papa glucosado (APG) o agar de extracto de malta (AEM). Las placas se colocaron en cámaras de crecimiento en oscuridad a 25°C y se examinaron con frecuencia para detectar el desarrollo de todas las colonias fúngicas que aparecían y que se aislaron en medio AEM o APG para obtener cultivos puros. La identificación de los aislamientos se realizó con base en la morfología de la colonia de los hongos, y de las estructuras reproductivas como conidióforos, los mecanismos de ontogenia de conidios y las características de los conidios, esporangios y forma y tamaño de esporas, así como también el tamaño y forma de las hifas, ramificaciones, células engrosadas, presencia de fibulas, siguiendo métodos y protocolos micológicos estándar. Todos los cultivos axénicos de los hongos obtenidos se examinaron mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio Modelo Leica DM 250 LED para la identificación a nivel de género y, utilizando técnicas moleculares, a nivel de especie .

Identificación molecular de los aislamientos.

A todos los morfotipos identificados se les extrajo ADN genómico total siguiendo el protocolo CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) modificado de Doyle & Doyle (1990), utilizando micelio (aproximadamente 100 mg) del mismo cultivo utilizado para la descripción morfológica. Los extractos de ADN se secaron al aire y se resuspendieron en 70 µl de agua ultrapura. Para comprobar la concentración de ADN, se utilizó una placa Multiskan™ SkyHigh µDrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Se amplificó la región del espaciador interno transcrito 1 5.8S, del espaciador interno transcrito 2 (ITS) con los primers ITS1 e ITS4 (White et al. 1990). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µL, con 1 µL de ADN, 9 µL de agua pura estéril, 1,25 µL de primer directo e inverso 10 µM y 12,5 µL de Promega GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El programa de amplificación general fue descrito por White et al. (1990) e incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguida de 32 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 90 s y una extensión final a 72 °C. Cuando no fue posible la amplificación se modificaron las condiciones de PCR descritas, variando la temperatura y los ciclos de amplificación. Para comprobar la concentración de los productos de PCR, se utilizó una placa Multiskan™ SkyHigh µDrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en CERELA-CONICET (San Miguel de Tucumán, Argentina). Los datos de secuencia generados se verificaron manualmente usando MEGA 10.1.5 (Kumar et al. 2018). Se utilizó la herramienta en línea del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al. 1997) seleccionando la opción de búsqueda de nucleótido-nucleótido (MEGABLAST), considerando el porcentaje de similitud mayor al 90% para género y mayor a 99% para especie.

Análisis de interacción *in vitro*: confrontación de los aislamientos contra *H. decorticans*.

Para analizar la posible interacción que los aislamientos obtenidos pudieran establecer frente al crecimiento de *Huntia decorticans*, se realizaron cultivos duales en placas con medio APG suplementadas al 2% con aserrín de *Nothofagus*. En cada placa se sembró un inóculo de 0.5 cm de diámetro de un cultivo puro del patógeno de 7 días de incubación y un inóculo de 0.5 cm de diámetro de un cultivo puro de 7 días de uno de los aislamientos antagonista, a una distancia de 5 cm de entre sí. Luego de la incubación, se dibujaron el eje central (eje C) y dos ejes a 45° (ejes laterales) en el reverso de la placa (Fig 9). Se prepararon tres réplicas por confrontación

aislamiento-patógeno. En el tratamiento control se colocó en ambas posiciones el mismo aislamiento de *H. decorticans*. Las placas se mantuvieron en condiciones de laboratorio durante seis días y se midió el incremento del margen de la colonia a lo largo de tres ejes, siguiendo la metodología de Santamaría et al. (2007). Se utilizaron diferentes tipos de indicadores para evaluar la interacción: a) longitud del eje central (eje C) del patógeno; b) coeficiente de forma, calculado como la diferencia entre el promedio del eje lateral y el eje central (cuando el valor del índice fue mayor que uno, se considera que el posible antagonista reduce el crecimiento del patógeno), c) porcentaje de inhibición del crecimiento radial (Royse & Ries, 1978), calculado mediante la ecuación $[100 \times (r1 - \text{eje C}) / r1]$, donde r1 es el radio máximo del patógeno en cualquier dirección; y d) zona de inhibición porcentual (Orole y Adejumo, 2009), calculada mediante la ecuación $[(A - B) / A] \times 100$, donde A es el radio del patógeno en la placa de control y B es el radio del patógeno en la placa de cultivo dual.

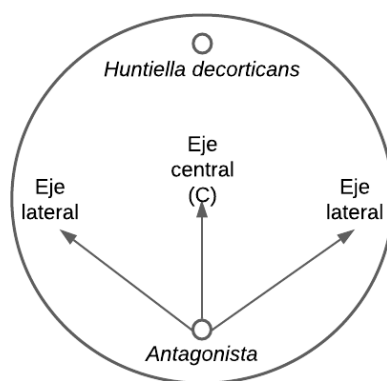


Fig 9. Esquema de confrontación en placa.

Efecto de los sobrenadantes de cultivos de aislamientos seleccionados sobre el crecimiento de *H. decorticans*.

Para determinar el potencial antifúngico de los sobrenadantes, se seleccionaron los aislamientos que causaron una mayor inhibición de crecimiento de *H. decorticans* en el ensayo de cultivo dual en placa, utilizando la metodología descrita por Hernández-Ochoa et al. (2019). El medio de cultivo líquido para la obtención de sobrenadante fue medio de papa glucosado (PG) (papa pelada 300/l, glucosa 10 g/l). El caldo de papa se prepara hirviendo la papa cortada en agua por 30 min y posteriormente se recupera el caldo filtrando por una gasa, se agrega la glucosa y se lleva a volumen. Para cada aislamiento seleccionado se prepararon, por triplicado, 50 ml de PG en Erlenmeyers de 150 ml y se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C en autoclave. Luego se inocularon discos de 5 mm de diámetro de los aislamientos en crecimiento en medio sólido y se

incubaron a 28°C, con agitación periódica. Los sobrenadantes se recuperaron mediante filtración utilizando papel Whatman® N°2 y luego por filtro de nitrocelulosa (tamaño de poro: 0.22 µm) para obtener un sobrenadante libre de células. Posteriormente, se prepararon placas de petri de 90 mm con medio agar papa glucosado (APG) (papa pelada 300 g/l, glucosa 10 g/l, agar 20 g/l), que se esterilizaron durante 15 minutos a 121° C en autoclave y, luego de que se haya enfriado pero no solidificado, el medio fue suplementado con los sobrenadantes de los cultivos líquidos de los potenciales antagonistas al 25 y 50 % (vsobrenadante/vtotal). El medio APG sin suplementación (0%) se utilizó como control negativo. Todos los medios agarizados se inocularon con un disco de 5 mm del aislamiento de *H. decorticans* en el centro de la placa. Estos se incubaron a una temperatura de 24° C durante 7 días y se midió el radio de crecimiento del micelio. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Para calcular el porcentaje de inhibición (%In) del crecimiento se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{Control - Sobrenadante}{Control} \times 100$$

Dónde Control corresponde al crecimiento de *H. decorticans* en el medio sin suplemento y Sobrenadante corresponde al crecimiento de *H. decorticans* en los medios suplementados en las diferentes concentraciones (25% o 50%).

Efecto del potencial hídrico sobre el crecimiento de los aislamientos antagonistas seleccionados y *H. decorticans*.

Para determinar la influencia del potencial osmótico en el crecimiento del micelio, se tomaron discos de micelio/agar de 10 mm de diámetro del margen en crecimiento activo de cada uno de los cultivos de 7 días y se transfirieron a placas de cultivo con medio APG. El medio APG se ajustó osmóticamente a 0, -1,0, -5,0 y -10,0 bares con glicerol (Harris 1981). Todos los valores se expresan en la Tabla 3. El potencial hídrico total fue la suma del potencial hídrico del APG (-0,4 MPa) y el potencial osmótico del glicerol añadido. Se distribuyó medio estéril (20 ml) ajustado con glicerol en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Se utilizaron tres placas replicadas para cada tratamiento y se incubaron a 24°.0 C en oscuridad durante 7 días. Se registró el crecimiento en cm y se estimó la velocidad de crecimiento como el cociente entre el radio de crecimiento del micelio y el tiempo de incubación (7 días).

Tabla 3. Concentración y potencial osmótico de los medios APG con glicerol.

Potencial osmótico (bars)	Conc. Molar (mol/l)	g/l
-1.0	0.04	3.68
-5.0	0.20	18.42
-10.0	0.40	36.84

Análisis estadístico.

Se evaluó la diversidad de aislamiento fúngicos de la madera en plantines de *N. dombeyi*. Se calcularon siguientes estimadores de diversidad alfa: índices de Shannon-Wiener, Simpson, Inverse Simpson y Fisher, así como también riqueza observada y abundancia. Los efectos del estado de las plantas (presencia/ausencia del patógeno y presencia/ausencia de riego) se evaluaron comparando las estimaciones de diversidad alfa para cada muestra. La diversidad beta de las comunidades fúngicas entre los diferentes niveles de las variables estudiadas se evaluó mediante el uso de índices de disimilitud: Whitaller, Sorensen y Jaccard calculados con datos tanto cuantitativos (abundancia relativa) como binarios (presencia-ausencia). El análisis se complementó con un enfoque funcional a fin de profundizar la comprensión de los patrones de diversidad de los aislamientos utilizando la base de datos FUNGuild v1.0 (Nguyen et al. 2016). Los índices ecológicos se midieron utilizando la biblioteca betapart V. 1.5.1 (Baselga et al. 2012) del paquete R Studio (versión 1.1.456 - © 2009-2018 RStudio, Inc).

Para evaluar cómo afecta la presencia de las especies de hongos en las variables de respuesta diámetro a la altura del cuello (dac), altura del tallo (h), largo de raíz (rT) y altura total (hT) en los diferentes tratamientos se realizó un modelo generalizado con una distribución de error binomial, usando la función 'glm' en el paquete r (Posit Team 2023).

En los ensayos de evaluación de los efectos antagonistas y el potencial osmótico, realizados por triplicado, se determinaron los valores medios y el error estándar, y se sometieron a un ANOVA. Las diferencias detectadas por ANOVA se analizaron mediante la prueba de Tukey. Se examinó la normalidad de los datos (prueba de Shapiro Wilks modificada, $\alpha = 0,05$) y la homocedasticidad (prueba de Levene, $\alpha = 0,05$). Se realizaron análisis no paramétricos cuando los conjuntos de datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$). Todos los análisis se realizaron con el software Infostat (Di

Rienzo et al. 2010). Las figuras se crearon con GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Resultados

Identificación de los aislamientos.

Se obtuvieron un total de 92 aislamientos, pertenecientes a 23 especies de 17 géneros distintos. Las especies más frecuentes en plántulas de *N. dombeyi* aislamientos con la metodología utilizada fueron *Phoma herbarum* (11.63%, 10 aislamientos) *Cadophora luteo-olivacea* (1.47%, 9 aislamientos) y *Paraphoma radicina* (10.47%, 9 aislamientos). A nivel de género, el más frecuente fue *Fusarium* (19.76%, 17 aislamientos) considerando todas las especies aisladas. *Huntia decorticans* pudo re aislarse 3 veces en el tratamiento 3 y 2 veces en el tratamiento 4 (5.81%, 5 aislamientos). Todas las frecuencias se expresaron en la Tabla 4 y se esquematiza en la Fig 10. El 83% de los aislamientos obtenidos correspondieron a representantes de Ascomycota, el 5% a Basidiomycota, el 2% a Mucoromycota y el 6,52% no pudieron ser identificados. Mientras que para Ascomycota, *Fusarium* spp. fue el género más frecuente, con una alta recuperación, agrupándolos en 4 especies diferentes, *Stereum* sp. y *Umbelopsis* sp. fueron para Basidiomycota y Mucoromycota, respectivamente. Los aislamientos clasificados como indeterminados corresponden a cultivos estériles de los cuales no se extrajo ADN para analizar o las secuencias resultaron de baja calidad.

Tabla 4. Frecuencia de aparición de los hongos aislados en todos los tratamientos y asignación de gremio ecológico de la base de datos Funguild.

Código de aislamiento		Gremio	% de ident*	Trat 1	Trat 2	Trat 3	Trat 4	Total	Frec. Rel.
MA-03	<i>Alternaria alternata</i>	Patógeno animal - Endófito - Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	97.52	2				2	2.33
MA-27	<i>Alternaria chlamydosporigena</i>	Endófito - Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	99.81				1	1	1.16
MA-09	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Endófito - Patógeno animal - Saprótrofo de la madera - Saprótrofo del suelo	100				1	1	1.16
MA-33	<i>Atradiymella muscivora</i>	G Nd	98.51				1	1	1.16
M-14	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	Endófito - Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	93.68	4		5		9	10.47
MA-06	<i>Cladosporium herbarum</i>	Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	100	1			1	2	2.33
MA-03	<i>Fusarium sp.</i>	Patógeno animal - Endófito - Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	99.78		2		6	8	9.30
M-09	<i>Fusarium oxysporum</i>	Patógeno animal - Endófito - Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	99.79		1		2	3	3.49
MA-31	<i>Fusarium redolens</i>	Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	92.71	3	1		1	5	5.81
MA-22	<i>Fusarium tricinctum</i>	Fitopatógeno	98.97				1	1	1.16
CIEFAPcc 428	<i>Huntia decorticans</i>	Fitopatógeno	100			3	2	5	5.81
MA-08	<i>Paraphoma radicina</i>	G Nd	100	2	4	3		9	10.47
MA-14	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	Fitopatógeno	99.63				1	1	1.16
MA-15	<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	Fitopatógeno	94.95				2	2	2.33
MA-12	<i>Pestalotiopsis uvicola</i>	Fitopatógeno	99.81		2		3	5	5.81
M-15	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	G Nd	99.60	3	1			4	4.65
MA-19	<i>Phoma herbarum</i>	Fitopatógeno	98.76	4	2		4	10	11.63
M-07	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Endófito - Fitopatógeno - Saprótrofo de la madera	99.84	1				1	1.16
M-01	<i>Robillarda sessilis</i>	Saprótrofo	100	2				2	2.33
M-12	<i>Stereum gausapatum</i>	Saprótrofo	99.82	2	1			3	3.49

<i>M-10</i>	<i>Truncatella angustata</i>	Fitopatígeno - Simbiótico	100				3	3	3.49
<i>MA-10</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	Fitopatígeno	100	2	2	1	1	6	6.98
<i>MA-11</i>	<i>Umbelopsis vinacea</i>	Saprótrofo indefinido	99.60	2				2	2.33
				28	16	12	30	86	100
Indeterminado				1	2	1	2	6	

* corresponde al porcentaje de identidad obtenido en Genbank

Abreviatura: G ND: Gremio no designado

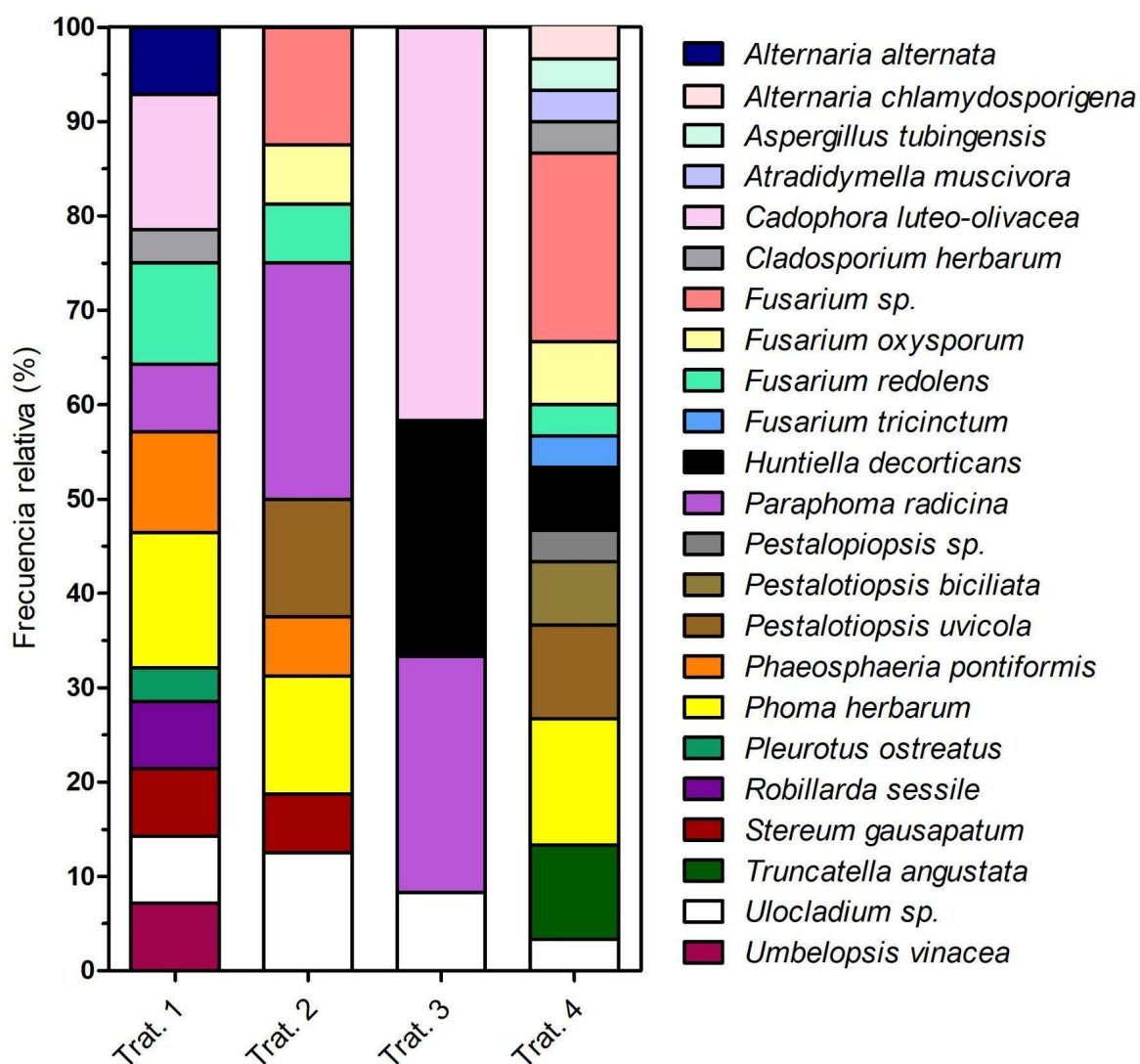


Fig 10. Frecuencia relativa de los taxones para cada uno de los tratamientos.

En la clasificación de los aislamientos en función de las condiciones ambientales impuestas para cada tratamiento se puede observar que hubo 4 especies que solo se presentaron en las condiciones control (riego normal y sin patógeno): *Alternaria alternata*, *Pleurotus ostreatus*, *Robillarda sessile* y *Umbelopsis vinacea*. Además del tratamiento control (Tratamiento 1), el aislamiento de *Cadophora luteo-olivacea* solo estuvo presente en el tratamiento con riego normal e inoculación del patógeno *H. decorticans* (Tratamiento 3), y *Phaeosphaeria pontiformis* y *Stereum gausapatum* en el tratamiento con limitación de riego (Tratamiento 2). Los aislamientos de las restantes 15 especies se encontraron distribuidos en los tratamientos con ambas condiciones (limitación de riego y presencia del patógeno). En la

Fig 10 se agrupan los aislamientos diferenciando aquellos que se encontraron particularmente en cada uno de los tratamientos.

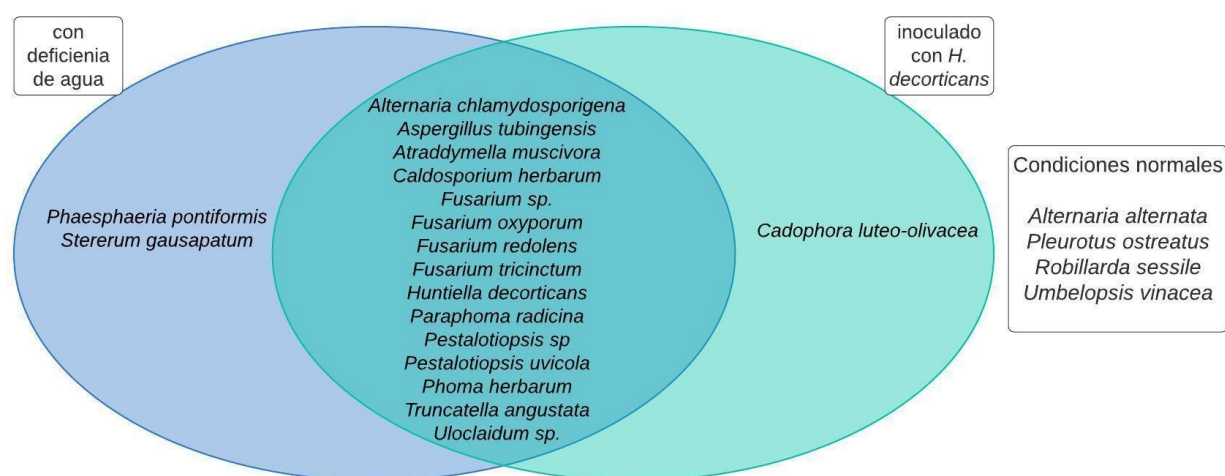


Fig 11. Distribución de los aislamientos identificados en los diferentes tratamientos.

Tabla 5. Índices de alpha y beta diversidad calculado para todo el set de datos y para cada diferente tratamiento

α diversidad				
	Trat1	Trat2	Trat3	Trat4
Riqueza de especies	12	9	4	15
Abundancia	28	16	12	30
Shanon-Wiener	2.40	2.08	1.27	2.50
Simpson	0.90	0.86	0.69	0.90
Inverse simpson	10.32	7.11	3.27	10.00
Fisher alpha	7.95	8.50	2.10	11.94

β diversidad						
	Trat1 vs Trat2	Trat1 vs Trat3	Trat1 vs Trat4	Trat2 vs Trat3	Trat2 vs Trat4	Trat3 vs Trat4
Especies compartidas	6	3	4	2	6	2
Whittaler	0.43	0.62	0.70	0.69	0.50	0.79
Sorensen	0.57	0.37	0.29	0.31	0.50	0.21
Jaccard	0.40	0.23	0.17	0.18	0.33	0.12

Los índices ecológicos (Tabla 5) muestran para la diversidad α valores más bajos en el tratamiento 3 (inoculado con *H. decorticans*). Esto significa que este tratamiento es el menos diverso. El tratamiento 4 (con patógeno y con déficit hídrico) y el tratamiento 1 (sin patógeno

y riego normal) se clasifican como los más diversos (índices más altos). Estadísticamente, para la riqueza y la abundancia, no hay diferencias significativas entre los tratamientos con y sin patógeno, es decir, entre los Tratamientos 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) y 2 (sin patógeno y con déficit hídrico) vs los Tratamientos 3 (con patógeno y sin déficit hídrico) y 4 (con patógeno y con déficit hídrico) (pvalor = 0.9143 para la riqueza y pvalor = 0.6286 para la abundancia), y tampoco entre los tratamientos con y sin deficiencia hídrica, entre los Tratamientos 1 y 3 vs 2 y 4 (pvalor = 3.143 para la riqueza y 0.2286 para la abundancia).

Para los índices de diversidad β los valores más altos indican mayor variabilidad o mayor similitud entre las comunidades, mientras que los valores más bajos indican lo contrario. El tratamiento 2 (sin patógeno y con déficit hídrico) es el tratamiento con más especies compartidas con los tratamientos 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) y 4 (con patógeno y con déficit hídrico) en donde se observaron 6 especies, y se obtienen índices de Sorensen y Jaccard más altos. Esto implica que las comunidades de especies en el tratamiento 2 (sin patógeno y con déficit hídrico) son más similares en términos de la combinación de especies presentes con los tratamientos 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) y 4 (con patógeno y con déficit hídrico). Estos índices indican una baja variabilidad en la composición de especies entre los tratamientos, pero una alta similitud entre las comunidades de especies en diferentes tratamientos.

El análisis de los aislamientos obtenidos y los parámetros fisiológicos reveló que el factor que afectaría el desarrollo de las plantas sería la restricción de agua. Para la variable *dac* (diámetro a la altura del cuello), se encontró que el tratamiento 2 (sin patógeno y con déficit hídrico) y el tratamiento 4 (con patógeno y con déficit hídrico) son significativamente diferentes del tratamiento 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) (pvalor < 0.001) (0.19 cm, 0.24 cm y 1.79 cm respectivamente). Además, el aislamiento de *Robillarda sessile* mostró un coeficiente significativo (pvalor = 0.017). En cuanto a la variable *h* (altura), no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento 2 (sin patógeno y con déficit hídrico), 3 (con patógeno y sin déficit hídrico) y 4 (con patógeno y con déficit hídrico) en comparación con el tratamiento 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) (todos los pvalores > 0.05). Para la variable *lr* (longitud de raíz), el tratamiento 2 (sin patógeno y con déficit hídrico) resultó ser significativamente diferente del tratamiento 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) (pvalor = 0.009) (25.19 cm y 32.68 cm respectivamente). Sin embargo, no se encontraron aislamientos que arrojaran valores significativos (pvalor < 0.05). Finalmente, para la variable *hT* (altura total), el tratamiento 4 (con patógeno y con déficit hídrico) fue significativamente diferente del tratamiento 1 (sin patógeno y sin déficit hídrico) (pvalor =

0.094) (93.68 cm y 75.73 cm respectivamente). Los aislamientos que mostraron coeficientes significativos fueron *Fusarium oxysporum* (pvalor = 0.038) y *Ulocladium sp.* (pvalor = 0.01180).

Análisis de interacción *in vitro*: confrontación de los aislamientos contra *H. decorticans*.

En las condiciones impuestas en el ensayo, 8 aislamientos mostraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *H. decorticans*. Todos los datos de crecimiento se muestran en la Tabla 6. El aislamiento de *Fusarium redolens* fue el que más inhibió al patógeno (33.33%). Por otra parte, *H. decorticans* inhibió el crecimiento de 3 aislamientos (*Paraphoma radicina*, *Pleurotus ostreatus* y *Truncatella angustata*). Por otro lado, *H. decorticans* muestra un gran crecimiento en el medio suplementado con chips de *Nothofagus*. En la Fig 12 se representan los porcentajes de inhibición de todos los aislamientos utilizados. En la Fig 13 se presentan las imágenes de los 5 aislamientos seleccionados para continuar con los ensayos.

Tabla 6. Resultados de los parámetros del ensayo de confrontación

Código de aislamiento		Longitud del eje central sin patógeno (cm/día)	Longitud del eje central del patógeno (cm)	Coefficiente de forma (cm)
MA-03	<i>Alternaria alternata</i>	0.52 ± 0.03 g	3.10 ± 0.14 bc	1.75 ± 1.77
MA-27	<i>Alternaria chlamydosporigena</i>	0.31 ± 0.09 cdef	4.50 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00
MA-09	<i>Aspergillus tubingensis</i>	0.35 ± 0.02 efg	3.15 ± 0.49 abc	0.00 ± 0.00
MA-33	<i>Atradiidymella muscivora</i>	0.28 ± 0.06 bcdef	3.30 ± 0.00 abc	-0.25 ± 0.35
M-14	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	0.26 ± 0.01 abcde	-	-
MA-06	<i>Cladosporium herbarum</i>	0.14 ± 0.01 ab	3.45 ± 0.21 abc	1.00 ± 1.41
MA-03	<i>Fusarium sp.</i>	0.30 ± 0.02 defg	3.30 ± 0.42 ab	0.25 ± 1.77
M-09	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.57 ± 0.14 fg	3.05 ± 0.07 bc	3.50 ± 1.41
MA-31	<i>Fusarium redolens</i>	0.48 ± 0.04 fg	2.40 ± 0.28 c	10.25 ± 3.89
MA-22	<i>Fusarium tricinctum</i>	0.25 ± 0.02 abcde	3.55 ± 0.21 abc	-0.25 ± 1.06
CIEFAPcc 428	<i>Huntia decorticans</i>	0.38 ± 0.04 efg	-	-
MA-08	<i>Paraphoma radicina</i>	-	3.20 ± 0.00	4.50 ± 0.00

<i>MA-14</i>	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	0.20 ± 0.01 abcd	0.64 ± 0.00 a abc	0.00 ± 0.00
<i>MA-15</i>	<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	0.07 ± 0.01 a	3.15 ± 0.07 bc	-0.50 ± 0.71
<i>MA-12</i>	<i>Pestalotiopsis uvicola</i>	0.30 ± 0.02 defg	3.55 ± 0.07 ab	0.75 ± 0.35
<i>M-15</i>	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	0.23 ± 0.01 abcd	3.90 ± 0.00 ab	0.00 ± 0.00
<i>MA-19</i>	<i>Phoma herbarum</i>	0.23 ± 0.01 abcd	3.70 ± 0.00 ab	0.00 ± 0.00
<i>M-07</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.48 ± 0.04 efg	3.50 ± 0.00 abc	1.00 ± 0.00
<i>M-01</i>	<i>Robillarda sessile</i>	0.27 ± 0.01 bcdef	4.25 ± 0.07 a	0.00 ± 0.00
<i>M-12</i>	<i>Stereum gausapatum</i>	0.19 ± 0.01 abc	4.00 ± 0.28 a	0.75 ± 1.77
<i>M-10</i>	<i>Truncatella angustata</i>	0.14 ± 0.02 ab	3.75 ± 0.35 ab	0.25 ± 3.18
<i>MA-10</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	0.30 ± 0.02 defg	2.95 ± 0.35 bc	2.25 ± 2.47
<i>MA-11</i>	<i>Umbelopsis vinacea</i>	0.39 ± 0.06 efg	3.30 ± 0.14 abc	3.00 ± 0.00

Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado ± DE. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0,05) entre los aislamientos

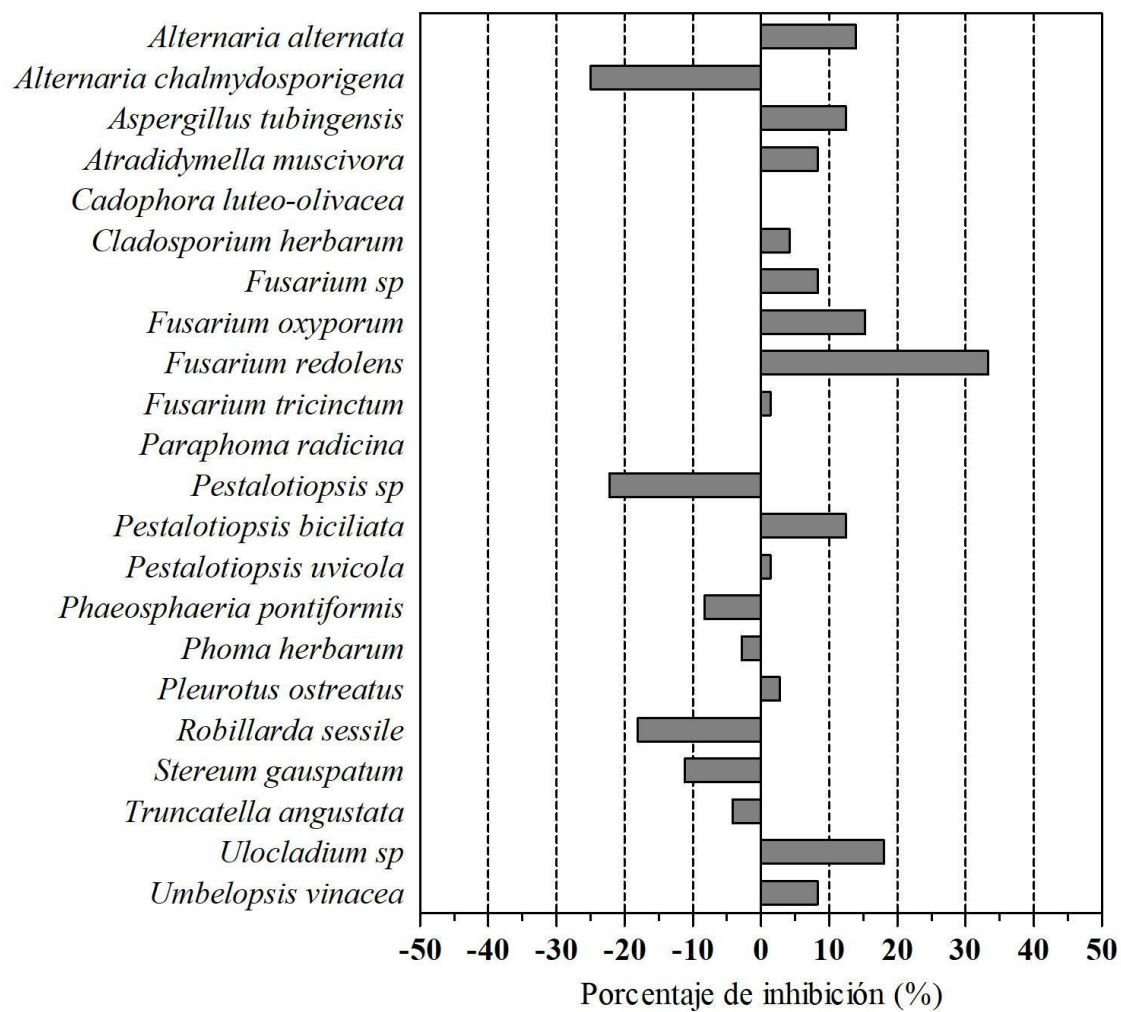


Fig 12. Esquema del porcentaje de inhibición de *H. decorticans* para todos los aislamientos evaluados.

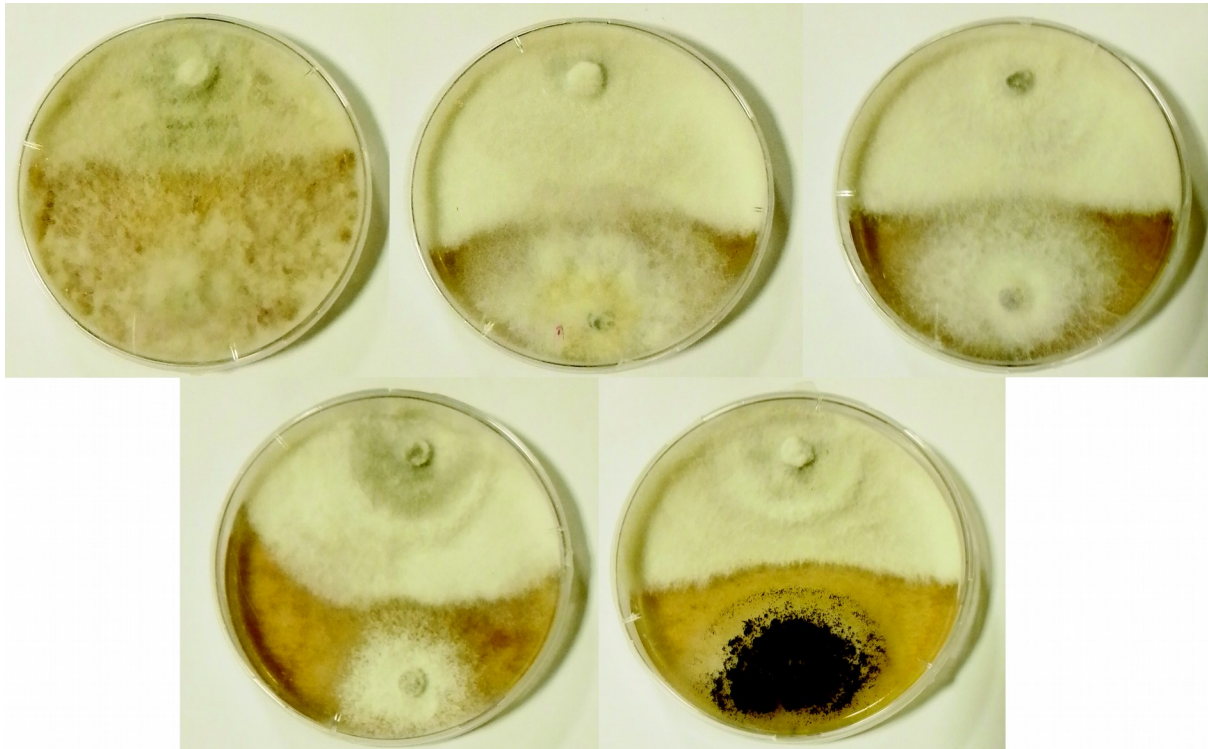


Fig 13. Cultivos duales en medio agarizado entre los endófitos seleccionados vs *H. decorticans*, ubicado en la parte superior de cada placa. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: *Fusarium redolens*, *Pestalotiopsis bicillata*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Ulocladium* sp.

Efecto de los sobrenadantes de aislamientos antagonistas sobre el crecimiento de *H. decorticans*.

Los sobrenadantes seleccionados mostraron diferencias significativas en las concentraciones utilizadas con los diferentes sobrenadantes (pvalor = 0.0001). En el tratamiento Control se evaluó el crecimiento de *H. decorticans* utilizando el medio de cultivo líquido sin sobrenadante de los otros aislamientos, y en este caso el crecimiento fue menor que cuando se le agregaron los sobrenadantes de *F. oxysporum* y de *A. alternata* al medio. Los valores más bajos de crecimiento de *H. decorticans* se obtuvieron con la adición del sobrenadante de *P. biciliata*. Se observaron diferencias significativas en la comparación de cada uno de los sobrenadantes en las diferentes concentraciones, para el caso de la adición de 25 % de sobrenadante, el pvalor = 0.0195, y para la adición de 50 % el pvalor = 0.0004. En ambos casos, *H. decorticans* tuvo un menor crecimiento con el sobrenadante de *P. biciliata* (0.23 cm/día con 25% y 0.15 cm/día con 50%). . Con respecto al sobrenadante de *F. redolens* no se pudo medir el crecimiento debido a que el método de filtración utilizado no lograba evitar que el sobrenadante esté libre de micelio o esporas de este hongo. Los valores de

crecimiento de *H. decorticans* con las diferentes concentraciones de los sobrenadantes seleccionados se expresan en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición de *H. decorticans* en medio sólido con los sobrenadantes de los diferentes aislamientos y con sobrenadante control con medio líquido sin crecimiento de ningún aislamiento.

Aislamiento	Concentración del sobrenadante			
	25 %		50 %	
	Vel. de crec (cm/día)	% de inhibición ¹	Vel. de crec. (cm/día)	% de inhibición ¹
Control	0.27 ± 0.03 ab	-	0.26 ± 0.05 b	-
<i>A. alternata</i>	0.29 ± 0.05 b	-7.41	0.28 ± 0.04 b	-7.69
<i>P. biciliata</i>	0.23 ± 0.04 a	14.81	0.15 ± 0.02 a	42.31
<i>F. oxysporum</i>	0.29 ± 0.04 b	-7.41	0.29 ± 0.03 b	-11.54
<i>F. redolens</i>	-	-	-	-

Valores obtenidos del crecimiento en cm/día de *H. decorticans*. Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado ± error estándar. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0.05) entre el crecimiento para cada una de las dos concentraciones utilizadas.

¹ el % de inhibición representa el crecimiento de *H. decorticans* en cada sobrenadante en comparación con el crecimiento en el medio control.

Efecto del potencial hídrico en el crecimiento de los aislamientos antagonistas y *H. decorticans*.

En el ensayo de potencial hídrico con diferentes concentraciones de glicerol, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos seleccionados. Los aislamientos de *H. decorticans* y *P. biciliata* fueron los que presentaron menor velocidad de crecimiento en todas las concentraciones de glicerol, siendo el tratamiento con -10 bars de potencial osmótico (mayor concentración de glicerol) donde *H. decorticans* exhibió menor crecimiento (0.07 cm/día). Los aislamientos de *Fusarium* presentaron las velocidades más altas, siendo *F. oxysporum* el que presentó los valores más elevados, excepto en el tratamiento con potencial osmótico de -1.0 bars (la concentración más baja de glicerol) donde el aislamiento de *F. redolens* obtuvo un valor más alto (0.55 cm/día para *F. oxysporum* vs 0.58 cm/día para *F. redolens*). Estadísticamente no hay diferencias significativas entre el crecimiento de *F. oxysporum* en los diferentes potenciales osmóticos (p valor = 0.1860). Mientras que para *F.*

redolens se encontraron diferencias significativas en los tratamientos siendo el -1.0 bars el mayor y el menor para -10.0 bars (pvalor = 0.0097). En el caso de *H. decorticans*, se observaron diferencias entre las concentraciones de glicerol (pvalor = 0.0046), mostrando una clara disminución con la mayor concentración de este compuesto (-10.0 bars de potencial osmótico). En todos los casos, los valores de crecimiento son menores que la de los aislamientos seleccionados, menos para los de *P. biciliata*. Este aislamiento a su vez tiene menor velocidad de crecimiento tanto en los medios de crecimiento utilizados en este ensayo como en el medio con aserrín del ensayo anterior en comparación con los otros aislamientos. Pero su mayor crecimiento se presenta a mayores concentraciones de glicerol, mostrando estadísticamente diferencias significativas (pvalor = 0.0066). Para el caso de las comparaciones entre los aislamientos para cada uno de los potenciales se observaron diferencias significativas para todos los potenciales (pvalor < 0.05). En el Fig 14 se comparan los valores de crecimiento de cada uno de los aislamientos en los diferentes tratamientos.

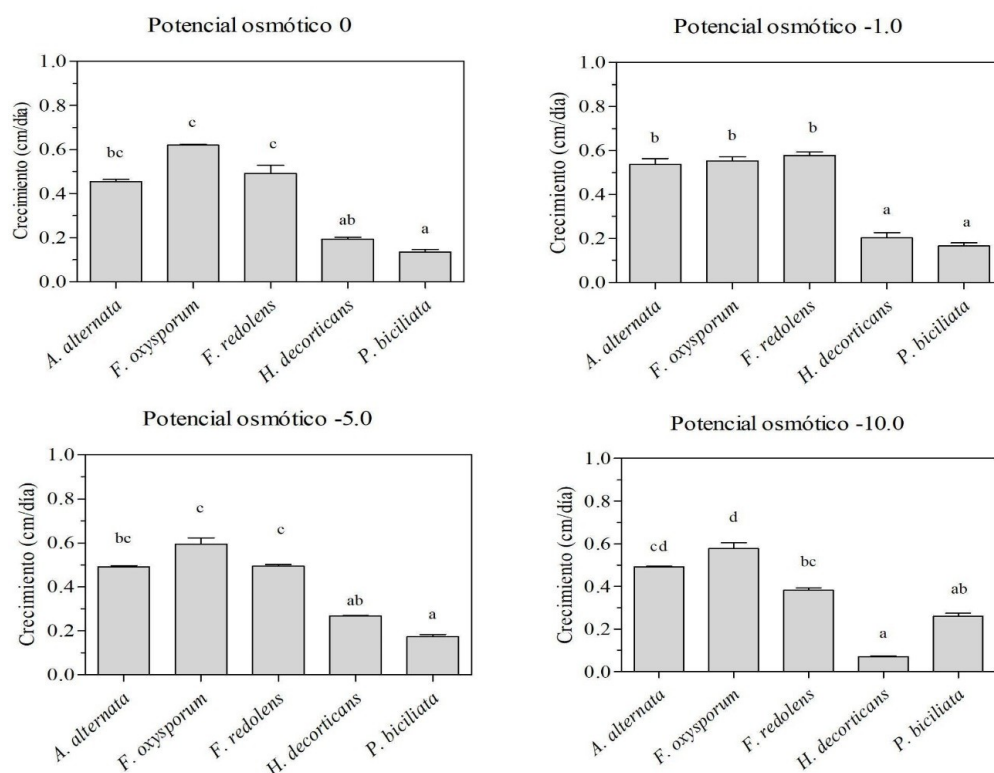


Fig 14. Comparaciones de potenciales entre los diferentes aislamientos. Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado $\pm$ error estándar. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0.05) entre los aislamientos para cada uno de los diferentes potenciales.

Discusión

Identificación de hongos y biodiversidad.

Nuestros resultados confirman que, como se reporta para la mayoría de los tejidos de plantas terrestres, los hongos que predominan pertenecen al filum Ascomycota, comprendiendo el 89% de los aislamientos, seguido de Basidiomycota (9%) y el resto a Mucoromycota (2%). Este patrón de predominio de Ascomycota en las comunidades endofíticas se ha observado de manera consistente en diversos estudios (Rana et al. 2019, Terhonen et al. 2019), independientemente de las técnicas de aislamiento utilizadas, lo que sugiere que es una característica inherente a este tipo de asociaciones simbióticas (Gazis & Chaverri, 2010, Jin et al. 2013, Stone et al. 2004). Sin embargo, no se puede definir una relación entre la frecuencia de los hongos aislados y las condiciones del agua y el estrés biótico impuestos en el ensayo, lo que indicaría que existen otros factores que podrían afectar la frecuencia de los mismos. Las condiciones ecológicas o ambientales, como la temperatura, la humedad y los niveles de nutrición del suelo, son factores importantes que afectarían indirectamente la estructura poblacional de los hongos endófitos (Jia et al. 2016). Como reportan Molina et al. (2020) en su trabajo en rodales de *N. dombeyi*, los árboles más afectados o que presentan características que indican decaimiento y mortandad están colonizados por hongos considerados patógenos. Esto indicaría que el decaimiento de la actividad biológica de la planta permitiría el ingreso o el ataque de hongos oportunistas frente a la susceptibilidad del hospedante a poder defenderse (Boddy & Rayner 1983). En nuestro trabajo encontramos, en el tratamiento sin ninguna presión ambiental, aislamientos reportados como patógenos como son *Alternaria alternata*, aislamientos del género *Fusarium* y degradadores de la madera como *Pleurotus ostreatus* y *Stereum gaustupatum*. Zhou et al. (2021) informaron un crecimiento mejorado de las plántulas de *Pinus tabulaeformis* después de la inoculación de una cepa endofítica de *Phoma* en condiciones de sequía. En *Pinus silvestri*, Giordano et al. (2009) aislaron *Aspergillus tubingensis* y *Cladosporium herbarum* y los asociaron con árboles de apariencia saludable y a *Alternaria alternata* con árboles en declive intermedio. Larrán et al. (2002) identificaron alrededor de 130 hongos endófitos donde *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum* son los de mayor frecuencia en plantas de trigo. Bhagyasree et al. (2018) aislaron y caracterizaron especies de *Fusarium* y *Aspergillus*, entre otros, como endófitos del maíz. Podemos decir entonces que la misma especie puede comportarse de manera diferente, pasando de endófito a patógeno y viceversa.

Algunas especies pueden ser inofensivas para ciertas plantas como endófitos, pero bajo estrés o debilidad del hospedante, pueden convertirse en patógenos y causar enfermedades (Ovando et al. 2005, Lana et al. 2011). Además, los hongos endófitos pueden actuar como agentes patógenos latentes y provocar interacciones asintomáticas (Schulz & Boyle, 2005; Gamboa-Gaitán, 2006). Por esta razón, es fundamental comprender los efectos fisiológicos de los hongos endófitos sobre las plantas, así como su potencial para proteger o mejorar la nutrición de las plantas.

La promoción del crecimiento vegetal mediante hongos endófitos ha sido ampliamente documentada en la literatura, destacando su capacidad para mejorar la absorción de nutrientes, producir fitohormonas y aumentar la resistencia al estrés abiótico (Liao et al. 2014, Lopez & Sword 2015, Jaber & Enkerli 2017, Fontana et al. 2021, Byregowda et al. 2022). Sin embargo, en el presente estudio, no se observaron efectos significativos en esta función. Esto se debe a la falta de ensayos específicos dirigidos a evaluar las interacciones entre los hongos endófitos obtenidos y las plantas hospedadoras.

También es necesario considerar que la frecuencia de aparición está determinada por la metodología de la obtención de los aislamientos. Los índices de diversidad indicarían que existe una homogeneidad entre las comunidades. Vandenkoornhuyse et al. (2002) observa que los estudios relacionados basados en algunas estrategias de aislamiento arrojan principalmente Ascomycetes, indicando que los métodos basados en el cultivo pueden seleccionar grupos específicos, sesgando así las percepciones con respecto a las comunidades de hongos existentes. Los análisis metagenómicos examinan la totalidad de los organismos presentes (Terhonen et al. 2019); sin embargo, representan un desafío para el cultivo en condiciones de laboratorio, ya que no es posible replicar las condiciones de interacción con la planta. Una desventaja del cultivo es que puede haber un sesgo hacia los hongos de rápido crecimiento y algunos hongos pueden ser difíciles de identificar debido a la falta de características morfológicas distintivas. Molina et al. (2022) reportaron una gran frecuencia de aparición de Agaricales y Helotiales en árboles maduros de *Nothofagus dombeyi*. En nuestro trabajo, los representantes de estos grupos son *Pleurotus ostreatus* en Agaricales y *Cadophora luteo-olivacea* en Helotiales. La secuenciación directa parece ser más eficiente para detectar hongos basidiomycetes en comparación con la detección en cultivo (Kernaghan et al. 2003, Menkis et al. 2005, Stenström et al. 2013). Por otro lado, también esta diferencia en *Nothofagus dombeyi* se puede deber a que se trabajó con plantines, en donde las condiciones de germinación y crecimiento inicial son controladas, y no con individuos adultos naturales. Los estudios sobre comunidades de hongos en viveros forestales muestran

una dominancia de hongos pertenecientes a Ascomycota, seguidos de Basidiomycota (Menkis et al. 2005, Menkis et al. 2010, Stenström et al 2013). Además, en plantas jóvenes, la comunidad de hongos endófitos suele ser menos diversa en comparación con plantas adultas, conforme la planta envejece, la composición de hongos cambia y se vuelve más diversa (Yu et al. 2024). Nuestros resultados coinciden con estudios previos que demuestran que las plántulas jóvenes son especialmente vulnerables a factores abióticos (Packer & Clay 2000, Merges et al. 2020).

Si bien los resultados muestran que determinados endófitos podrían tener alguna influencia sobre parámetros morfológicos, el efecto del tratamiento es más fuerte que el efecto del hongo mismo. Si el tratamiento afecta el crecimiento de alguna parte, favorece el desarrollo de determinadas especies. Como sugieren Molina et al. (2020) los hongos endófitos tienen un papel secundario en los procesos de daño sanitario de los árboles, favoreciendo el crecimiento de estos mismos principalmente como una expresión de estrés causado por factores climáticos. La sequía es frecuentemente responsable de la reducción del crecimiento de las plantas y tanto las raíces como las partes aéreas de las plantas pueden verse afectadas. Sin embargo, Hossain et al. (2019) muestra que hay patógenos específicos que aumentan su lesión en plantas por más que tengan condiciones normales de riego. En nuestro trabajo, si bien introdujimos al sistema al patógeno *H. decorticans* inoculando las plantas, también encontramos endófitos reportados como patógenos, como *Fusarium oxysporum* y *Robillarda sessile*, que podrían estar afectando negativamente a la planta.

Diferentes estudios han evaluado la producción de fitotoxinas en las especies reportadas en este trabajo. *Alternaria alternata* y *Cladosporium* producen las toxinas de perilenoquinona que afectan el fotosistema II de la planta y aumentan el contenido de especies reactivas de oxígeno en la célula, aumentando así la permeabilidad de la membrana (Daub et al. 2009). La fitotoxina del ácido fusárico (FSA) (producida por *Fusarium oxysporum*) altera las actividades respiratorias en las mitocondrias y daña las membranas de la célula huésped, lo que provoca la pérdida de agua en las hojas (Dong et al. 2012, Liu et al 2020). Dang et al. (2022) reporta toxinas en extractos de *Paraphoma radicina* y la consideran patogénica para alfalfa, afectando a las raíces. Muchas fitotoxinas inhiben la actividad enzimática de las plantas y alteran la biosíntesis de metabolitos críticos. Por ejemplo, la toxina AAL (producida por *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*) inhibe la actividad del L-aspartato (Berestetskiy, 2008). *Phoma herbarum* produce una antraquinona dimérica, tóxica para las malezas *Parthenium hysterophorus*, *Lantana camara* e *Hyptis suaveolens* mostrando su potencial como herbicida (Quereschi et al.2011), así como también nonenolides que

inhiben el crecimiento de la radícula de plántulas de *Amaranthus hypocondriacus* (Rivero-Cruz et al. 2000).

Análisis de interacción in vitro y efecto de los sobrenadantes seleccionados en el crecimiento de *H. decorticans*

En este estudio mostramos la capacidad de ciertos aislamientos para inhibir el crecimiento de *H. decorticans*. Pudimos observar que algunos aislamientos que inhibieron el crecimiento de *H. decorticans* se reportan como patógenos en otros huéspedes. La incorporación de aserrín al medio de cultivo es clave para intentar comprender la naturaleza del patógeno. La biomasa del hongo aumenta cuando el medio de cultivo se prepara junto con el sustrato del que fue aislado, y disminuye considerablemente en los medios tradicionales (APG, MEA). Es importante considerar que trabajar con microorganismos endófitos puede ser complicado, ya que requiere tener en cuenta ciertos aspectos específicos. Por ejemplo, los hongos endófitos necesitan mantener condiciones precisas de cultivo, como temperatura, pH, entre otros. Estudios previos han demostrado que estos factores son cruciales para el crecimiento y la funcionalidad de estos tipos de hongos (Smith et al. 2010, Johnson y Miller, 2012). Las relaciones entre hongos endófitos y plantas huésped no son estáticas y pueden cambiar según las condiciones ambientales y el estado fisiológico de la planta. Schulz & Boyle (2005) describen este espectro de interacciones como un "continuum endofítico", donde los hongos pueden ser mutualistas bajo ciertas circunstancias y patógenos en otras. En especies forestales, esto es particularmente relevante, ya que los endófitos pueden contribuir a la salud del árbol al mejorar su resistencia a enfermedades o al estrés ambiental, como señala Sieber (2007).

En las condiciones impuestas por el ensayo, se observaron diferencias del crecimiento de *H. decorticans* cuando el medio de cultivo estaba enriquecido con el sobrenadante de cultivo de *P. biciliata*. A pesar de que este aislamiento tuvo un crecimiento mucho más lento que los aislamientos en los ensayos anteriores, en este caso logró disminuir el crecimiento de *H. decorticans*. Las especies de *Pestalotiopsis* son fitopatógenos comunes que causan una variedad de enfermedades, incluidas lesiones cancras, muerte regresiva de los brotes, manchas en las hojas, además de tizón en las agujas, tizón en las puntas, tizón gris, clorosis severa y diversas enfermedades poscosecha (Maharachchikumbura et al. 2014, Xu et al. 2014). Además, se ha reportado dentro del género la producción de compuestos antifúngicos,

como Jesterone e Hidroxijesterone, inhibidores del crecimiento de patógenos de los géneros *Phytophthora*, *Phytium* y otros (Li & Strobel, 2001). Yang et al. (2011) reportan que *Pestalotiopsis* produce micotoxinas e inhibe el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, y *Phytophthora nicotianae*. También Calderón et al. (2022) reporta cierta inhibición en el crecimiento de bacterias patógenas con aislamientos de *Fusarium* y *Pestalotiopsis* aunque no son las más inhibitorias. El género *Pestalotiopsis* ha demostrado que produce una amplia gama de metabolitos secundarios diversos, como alcaloides, terpenoides, lactonas, fenoles, y sus derivados (Xu et al. 2010). En nuestro trabajo, registramos que *Pestalotiopsis biciliata* en contacto con *H. decorticans* inhibe el crecimiento de este un 12 % pero los metabolitos del sobrenadante lo reducen más, hasta un 50 %. La inhibición del sobrenadante podría depender de la concentración de los metabolitos de *P. biciliata*, la efectividad de un compuesto inhibidor aumenta con la concentración (Vinale et al. 2010, Angermayr et al. 2022). A su vez, estudios genómicos del género *Huntia* han detectado genes relacionados con la patogenicidad, involucrados con la biosíntesis de ergosterol, terpenos y sideróforos y otros compuestos (Cale et al. 2019, Sayari et al. 2021, Soal et al. 2022) que podrían inhibir el crecimiento o la actividad de *P. biciliata* en el ensayo dual en placa.

Alternaria alternata, *Fusarium redolens*, *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis biciliata* y *Ulocladium sp.* presentan una clara inhibición del crecimiento en las condiciones de confrontación con *H. decorticans*. Los hongos del género *Ulocladium* son saprófitos del suelo y algunas especies, incluidas *U. atrum* y *U. oudemansii*, tienen potencial para su uso en el control biológico de enfermedades foliares, como las causadas por los géneros patógenos de plantas *Sclerotinia* y *Botrytis* (Yohalem et al. 2004, Köhl et al. 2017, Ronseaux et al. 2013). *Alternaria* es un género de hongos que incluye especies saprofitas, endofíticas y patógenas (Thomma, 2003). *Alternaria alternata* es capaz de ser patógena en más de 100 plantas hospedantes, causando manchas foliares y tizones en muchas partes de la planta (Thomma, 2003). Además, muestra una variedad producción de metabolitos con diferentes tipos de actividad biológica, como actividad fitotóxica, citotóxica y antimicrobiana (Lou et al. 2013). En los ecosistemas forestales, *A. alternata* compite con otros microorganismos como *Fusarium spp.*, *Phytophthora spp.* y *Botrytis cinerea*. La competencia puede estar influenciada por varios factores, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, las condiciones ambientales y las interacciones microbianas. Por ejemplo, *Fusarium spp.* y *Phytophthora spp.* son conocidos por su agresividad y capacidad para colonizar rápidamente las plantas hospedadoras, lo que puede limitar la colonización de *A. alternata* (Ploetz, 2013). Soltani &

Hosseyini Moghaddam (2014) reportan metabolitos de *A. alternata* con actividades antiproliferativas, inhibidoras del crecimiento y antibacterianas contra *Pyricularia oryzae* y las bacterias patógenas *Bacillus sp.*, *Erwinia amylovora* y *Pseudomonas syringae*, además de fitopatógenos *Diplodia serieta*, *Phaeobotryon cupressi* y *Spencermartinsia viticola*. Castaldi et al. (2023) reportan una competencia contra *Botrytis cinerea*, y consideran que el hongo más virulento tiene una ventaja competitiva dentro del huésped, que conduce a la exclusión de hongos menos virulentos. Qiang et al. (2010) reportan que la toxina AAC producida por *Alternaria alternata* tiene actividad herbicida. Puede controlar un amplio espectro de malezas, entre ellas tanto gramíneas como malezas de hoja ancha, y tiene una tasa de eliminación rápida, similar a la del paraquat (Peng et al. 2021). Zheng et al. (2017) encontraron que *A. alternata* podía parasitar a *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, causante de roya rayada (amarilla) en el trigo. La prueba de patogenicidad y el examen microscópico mostraron que una cepa de *A. alternata* fue capaz de reducir la producción y viabilidad de urediniosporas, lo que indica un potencial como agente de control biológico contra la roya lineal del trigo.

Por otra parte, *Fusarium oxysporum* es reportado como causante de pudrición, marchitez y necrosis de las raíces en una gran cantidad de plantas y ocupa el quinto lugar entre los 10 principales patógenos vegetales de importancia científica y económica (James et al. 2000, Dean et al. 2012, Geiser et al. 2013). Sin embargo, también ha demostrado ser un agente protector en pimiento contra varios patógenos, como *Verticillium dahliae*, *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea* (Díaz et al. 2005). El mecanismo de dicha protección parece ser la resistencia inducida, utilizando una señalización de etileno (Díaz et al. 2005). La inducción por *Fusarium* provocó un aumento en la actividad quitinasa y los fenólicos de la pared celular, así como una mejora en la expresión de genes de defensa (Díaz et al. 2005, Silvar et al. 2009). En *Hordeum vulgare*, la presencia de *F. oxysporum* pudo conferir resistencia a enfermedades contra patógenos virulentos (Schulz et al. 1999). Esta resistencia se relaciona con las crecientes concentraciones de metabolitos fenólicos en la planta. Shah et al. (2019) demostraron que *Fusarium sp.*, aislado a partir de la raíz de *Dendrobium moniliforme*, logró promover el crecimiento y desarrollo de *Rhynchosyilis retusa*. Además, Cui et al. (2018), informaron anteriormente la capacidad de tres aislamientos de endófitos de *F. redolens* de promover la germinación de semillas de *C. songaricum*. Aislamientos de *F. oxysporum* aislado de *C. odorata* (Toghueo et al. 2020) y *F. oxysporum* aislado de *R. apiculata* (Moron et al. 2018) mostraron un amplio espectro antimicrobiano contra varios microorganismos patógenos, lo que indica la posibilidad de metabolitos bioactivos

potenciales. Se informó que la beauvericina, aislada de extractos de *F. oxysporum* y *F. redolens*, exhibió una amplia actividad antibacteriana (Xu et al. 2010). Otro mecanismo de protección con una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum*, inhibe al patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* y reduce los síntomas de la pudrición de la raíz en el tomate (*Solanum lycopersicum*). La inoculación en plantas de tomate de una carga de esporas 50 veces mayor que la del patógeno, asegura que las esporas de *F. oxysporum* no patogénica compiten con *F. oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* por la misma fuente de carbono, lo que reduce la disponibilidad de nutrientes para este último microorganismo (Bolwerk et al. 2005).

Efecto del potencial hídrico en el crecimiento de los aislamientos antagonistas y *H. decorticans*.

Los hongos que habitan en la madera varían considerablemente en su capacidad para crecer con un bajo contenido de agua. Boddy (1983) estudió las relaciones hídricas de 12 especies de Basidiomycetes de zonas templadas que habitan en la madera y descubrió que todas crecían muy lentamente o no crecían en absoluto en agar malta a un potencial hídrico de -4.4 MPa. Otros autores, registraron resultados similares (Tresner & Hayes, 1971, Clarke et al. 1980, Eamus & Jennings, 1986). En nuestro trabajo vemos que *H. decorticans* tiene su mayor crecimiento a un potencial hídrico de -5.0 MPa, como muestra Klepzig et al. (2004), para *Ophiostoma minus*. A su vez, este autor menciona que el crecimiento de los hongos asociados a insectos, como en nuestro caso *H. decorticans*, se ve fuertemente afectado por la disminución del potencial hídrico (Klepzig et al. 2004). Independientemente del medio utilizado para controlar el potencial hídrico, la tendencia general es una disminución en el crecimiento del micelio radial con una disminución del potencial hídrico (Whiting y Rizzo 1999).

El aislamiento identificado como *F. oxysporum* no mostró diferencias significativas en las diferentes concentraciones de glicerol, pero si con el resto de los aislamientos. Se ha reportado que, en condiciones de alta humedad, *F. oxysporum* encuentra un ambiente ideal para su crecimiento y dispersión, y sugiere que la presencia de alta humedad en el suelo promueve la incidencia en el hospedante (Thatcher et al. 2016, Rahman et al. 2021). Sin embargo, también se reporta en condiciones de sequía, donde el estrés hídrico puede causar lesiones en las raíces, lo que facilita su entrada a la planta (Thatcher et al. 2016). En nuestro trabajo no podemos asegurar la funcionalidad de estos aislamientos de *F. oxysporum*. La

inhibición de *H. decorticans* en el ensayo de confrontación y en el de potencial osmótico demuestran la plasticidad de esta especie frente a diferentes condiciones de cultivo.

Fusarium redolens es menos conocido, pero también presenta características interesantes respecto a su respuesta al potencial hídrico. Al igual que otros miembros del género *Fusarium*, *F. redolens* puede sufrir una reducción en su tasa de crecimiento bajo condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, su capacidad para producir micotoxinas y causar enfermedades se ve severamente afectada (Leslie y Summerell, 2006).

Para el caso de *Alternaria alternata* su crecimiento y patogenicidad es altamente dependiente de la disponibilidad de agua (Thomma, 2003). Un potencial hídrico óptimo favorece la germinación de esporas y el desarrollo de micelio, mientras que condiciones de estrés hídrico pueden inhibir su crecimiento y virulencia (Rotem, 1994, Thomma, 2003).

Conclusión

Se aislaron e identificaron 86 diferentes hongos endófitos asociados a la madera diferenciada en plantines de *N. dombeyi* cultivados bajo condiciones contrastante de disponibilidad de agua y bajo estrés biótico causado por el hongo fitopatógeno *Huntia decorticans*. Se evaluó la capacidad de estos aislamientos para inhibir *in vitro* el crecimiento del mencionado fitopatógeno, iniciando los estudios sobre los mecanismos que los hongos endófitos involucran en estos procesos de interacción en ensayos con cultivos duales bajo condiciones controladas.

El estudio permitió comprender mejor la compleja interacción entre hongos endófitos y su planta hospedante. Los resultados evidencian que la diversidad y la actividad de los hongos endófitos juegan un papel crucial en la capacidad de las plántulas para tolerar condiciones adversas, tales como la sequía y la presencia de patógenos como *Huntia decorticans*. El aislamiento y la caracterización de diversos hongos endófitos, así como el análisis de su potencial antagonista frente a *H. decorticans*, mostraron que *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Pestalotiopsis biciliata* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* del patógeno. Sin embargo, al existir datos sobre aislamientos específicos de estos taxones como fitopatógenos, son necesarios estudios adicionales utilizando los aislamientos obtenidos en esta tesis para confirmar su habilidad como agentes controladores, en cuanto se postulen para el desarrollo de bioinsumos para estrategias de manejo sostenible de bosques afectados por sequía y enfermedades. En este sentido es de destacar la capacidad del aislamiento de *Pestalotiopsis biciliata* para sintetizar metabolitos difusibles que inhiben el

crecimiento de *H. decorticans*. Este hallazgo sugiere la posibilidad de evaluar la capacidad antifúngica de compuestos específicos sintetizados por este hongo. En lugar de centrarse únicamente en la interacción directa entre hongos en la confrontación, podría ser beneficioso investigar los metabolitos secundarios u otros compuestos bioactivos que estos producen. Estos compuestos podrían ser utilizados como agentes antifúngicos naturales, proporcionando una estrategia alternativa y complementaria para el manejo de enfermedades.

La interacción dinámica entre *Nothofagus dombeyi* y sus hongos endófitos no solo contribuye a la resiliencia de las plantas frente a factores abióticos y bióticos, sino que también abre nuevas vías para el desarrollo de métodos de biocontrol que pueden mitigar los impactos negativos del cambio climático y las infecciones patogénicas en los ecosistemas forestales

CAPÍTULO 2

Identificación de aislamientos del género *Umbelopsis* y análisis de la producción de lípidos y lipasas

Introducción

Las especies de *Umbelopsis* (Umbelopsidales, Mucoromycotina, Mucoromycota) están bien documentadas como productores de lípidos y lipasas (Buráňová et al. 1990, Shimizu & Jareonkitmongkol 1995, Gaspar et al. 1999, Chatzifragkou et al. 2011, Takó et al. 2012, Kotogán et al. 2014, Kosa et al. 2018, Dzurendova et al. 2020). Las patentes y cepas comerciales de *Umbelopsis isabellina* y *Umbelopsis vinacea*, entre otras, se utilizan en la industria para la producción de lubricantes, detergentes, shampoo, cosméticos y formulaciones de tensioactivos (Papanikolaou et al. 2007, Chatzifragkou et al. 2010, Song et al. 2019, El-Baz et al. 2021). Aunque la clasificación tradicional interespecífica de *Umbelopsis* se basa principalmente en características morfológicas (Wang et al. 2015), la identificación mediante técnicas moleculares basadas en ADN reveló que taxones morfológicamente similares a *Umbelopsis*, como *Mortierella sensu lato*, pertenecen a dos grupos monofiléticos diferentes, identificados como *Mortierella* y *Umbelopsis* (Meyer & Gams 2003). Se ha informado que las especies de ambos géneros son saprótrofos que podrían llegar a ser dominantes en el suelo forestal tras una perturbación (Sukdeo et al. 2019). Estos organismos desempeñan un papel crucial en la descomposición de materia orgánica y el reciclaje de nutrientes, lo que contribuye a la recuperación y sostenibilidad de los ecosistemas forestales. Además, las especies de *Umbelopsis* no sólo actúan como saprótrofos, sino que también tienen la capacidad de establecer relaciones endofíticas con diversas plantas. Investigaciones realizadas por Amos & Barnett (1966), Huang et al. (2015), Qin et al. (2018), y Wang et al. (2017) han reportado que estas especies pueden habitar el interior de las plantas sin causarles daño aparente, lo que sugiere un posible papel en la promoción del crecimiento y la protección contra patógenos ampliando nuestro entendimiento sobre la diversidad ecológica y funcional de *Umbelopsis*.

En la Patagonia, existen pocos registros de *Umbelopsis*, con aislamientos principalmente provenientes de suelo y hojarasca, cuya identificación se basó en rasgos

morfológicos (Cabello 1997, Martínez & Valenzuela 2003, Bruzone et al. 2015, Soteras et al. 2017, Eliades et al. 2019). Estos registros proporcionan una base importante para el conocimiento de la presencia de *Umbelopsis* en la región. Recientemente, se obtuvieron aislamientos de *Umbelopsis* como endófitos de la albura de *Nothofagus*, lo que amplía significativamente nuestra comprensión de la distribución y el comportamiento ecológico de este género en ambientes patagónicos (Molina et al. 2020). Sin embargo, aún no hay información sobre la capacidad de los aislamientos de *Umbelopsis* de climas fríos para producir lípidos y lipasas, compuestos que podrían tener un gran potencial como herramientas biotecnológicas, especialmente considerando los estudios previos que han demostrado la utilidad de lípidos y lipasas producidos por hongos de este género en diversas aplicaciones (Weinstein et al. 2000; Collins & Gerday 2017).

En este capítulo se utilizaron criterios moleculares para identificar taxonómicamente aislamientos que son morfológicamente similares a los taxones *Mortierella* y *Umbelopsis*, obtenidos de bosques patagónicos de *Nothofagus*. También se estudió la capacidad de estos hongos para sintetizar lípidos y el potencial para producir lipasas extracelulares en diferentes cultivos.

Materiales y métodos

Aislamientos utilizados

Se utilizaron doce cultivos de hongos, los cuales fueron aislados de bosques patagónicos de *Nothofagus* y previamente identificados como *Mortierella* de la colección del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, y *Umbelopsis* de la colección del Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino patagónico (Tabla 8). Ocho de estos fueron aislados como endófitos en la albura y raíces de árboles de *Nothofagus dombeyi* (Molina et al. 2020) y 3 de suelo (Cabello 1997). Los aislamientos se mantuvieron a 4 °C en medio MEA (extracto de malta 2%, levadura extracto 0,2% y agar 2%).

Tabla 8. Aislamientos utilizados en este estudio, indicando datos de recolección y sustratos.

Número de colección	Sustrato/Hospedante	Origen	Lugar
CIEFAPcc 681	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Albura de árbol decaído	Lago Menéndez, PNLA
CIEFAPcc 684	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Albura de árbol vivo	Cerro Alto el Petiso,

CIEFAPcc 685	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Albura de árbol decaído	PNLA Lago Menéndez, PNLA
CIEFAPcc 686	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Raíz	Río Alerce, PNLA
CIEFAPcc 687	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Albura de árbol decaído	Lago Menéndez, PNLA
CIEFAPcc 688	<i>Nothofagus pumilio</i>	Albura de árbol vivo	Cerro El Risco, PNLA
CIEFAPcc 689	<i>Nothofagus pumilio</i>	Albura de árbol decaído	Cerro Alto el Petiso, PNLA
CIEFAPcc 690	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Albura de árbol vivo	Lago Menéndez, PNLA
CIEFAPcc 691	<i>Nothofagus pumilio</i>	Raíz	Cerro El Risco, PNLA
LPSc 36	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Suelo de bosque	Ushuaia, TdF
LPSc 520	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Suelo de bosque	Río Pipo, Ushuaia, TdF
LPSc521	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Suelo de bosque	Río Pipo, Ushuaia, TdF

Abreviaciones: PNLA, Parque Nacional Los Alerces (Chubut, Argentina); TdF, Tierra del Fuego, (Argentina), CIEFAPcc, Colección de Cultivos del Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino patagónico; LPSc, Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, Colección de la Universidad Nacional de La Plata.

Identificación morfológica

La caracterización morfológica se realizó con base en el cultivo y características microscópicas después de 7 días en medio agar extracto de malta (AEM). Para estimular la esporulación, los aislamientos se cultivaron en placas de agar agua y se mantuvieron en oscuridad a 28 °C hasta 20 días. Para observar las características microscópicas (estructuras reproductivas y vegetativas), se montaron filamentos de micelio en solución de floxina y se observaron al microscopio óptico (Modelo Leica DM 250 LED).

Identificación molecular

El ADN genómico total se extrajo mediante la técnica de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) con el protocolo de Doyle y Doyle (1990) modificado, utilizando micelio (ca.100 mg) del mismo cultivo utilizado para la descripción morfológica. Los pellets de ADN se secaron al aire y se resuspendieron en 70 µL de agua ultrapura. Para comprobar la concentración de ADN, se utilizó una placa Multiskan™ SkyHigh µDrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y la integridad se examinó en geles de agarosa al 0,8%. Se analizaron

dos regiones genéticas: se amplificó la región del espaciador interno transcrito 1 5.8S, del espaciador interno transcrito 2 (ITS) con los primers ITS1 e ITS4 (White et al. 1990); y parte de la región de la subunidad mayor del gen r28S del ADN ribosómico (LSU) con los primers LROR y LR5 (Vilgalys y Hester 1990). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µL, con 1 µL de ADN molde, 9 µL de agua ultrapura estéril, 1,25 µL de primer forward y reverse, y 12,5 µL de Promega GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Para ITS, el programa de amplificación incluyó desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 32 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C por 90 s, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Para LSU, el programa de amplificación implicó la desnaturalización a 96 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 60 min y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min (Wagner et al. 2013). Para comprobar la concentración de los productos de PCR, se utilizó una placa Multiskan™ SkyHigh µDrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en CERELA-CONICET (San Miguel de Tucumán, Argentina). Las secuencias obtenidas se verificaron manualmente usando MEGA 10.1.5 (Kumar et al. 2018). Se realizaron búsquedas BLAST utilizando el algoritmo BLASTn para recuperar secuencias similares de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando máxima verosimilitud (ML) con el programa RAxML 7.2.8 (Stamatakis 2014) e inferencia bayesiana (BI) con Mr. Bayes v3.2.7 (Ronquist et al. 2012). Se seleccionaron modelos de sustitución para cada conjunto de datos con el criterio de información de Akaike (AIC) utilizando jModelTest 3.7 (Posada 2008). Para BI, se ejecutaron cuatro cadenas MCMC simultáneamente en MrBayes v3.2.7 desde un árbol de inicio aleatorio durante 5.000.000 generaciones. Se tomaron muestras de árboles cada 1000 generaciones. Se descartaron los árboles muestreados del primer 15% de las generaciones. Las probabilidades posteriores se calcularon a partir de un árbol de consenso generado a partir de los árboles restantes. El árbol generado en este análisis se editó en el software FigTree V1.4.2 (Yrew Rambaut, Instituto de Biología Evolutiva, Universidad de Edimburgo). *Mortierella verticillata* CBS 220.58 (JN943795/JN940873) fue elegida como grupo externo, siguiendo el protocolo utilizado por Wang et al. (2014). Las secuencias generadas en este estudio se depositaron en GenBank (ITS: OP380965 a OP380976, LSU: OP381093 a OP381100) y los alineamientos en TreeBASE (<https://treebase.org>) (ID de estudio 30057).

Análisis del crecimiento y producción de lípidos en medio sólido

Para evaluar el crecimiento fúngico se inocularon discos de agar de 6 mm de diámetro de cada aislamiento puro en cajas de Petri 2 medios agarizados distintos: medio AEM (agar extracto de malta) y un medio que promueve la síntesis de lípidos que contenía 80 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, 4 g de KH_2PO_4 , 3 g de NaNO_3 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 20 g de agar por litro de agua destilada, ajustado a pH 7, siguiendo el protocolo de Papanikolaou et al. (2004) modificado. El crecimiento fúngico se estimó midiendo el radio del micelio (cm) durante 7 días para cada tratamiento. Posteriormente se tomó una porción de micelio de los cultivos para observación microscópica. Los lípidos neutros contenidos en el micelio se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Modelo Leica DM 250 LED) con fluoróforo BODIPY, en dilución 1/500 del colorante en tampón PBS, utilizando cubos de filtro de excitación y emisión adecuados (Wang et al. 2018). La tinción se llevó a cabo durante 20 min a temperatura ambiente.

Crecimiento de hongos y producción de lípidos en medio líquido

Para analizar la síntesis de lípidos, los experimentos se realizaron en Erlenmeyer de 250 ml que contenían 25 ml de medio compuesto por (g/l): 80 glucosa, 10 extracto de levadura, 4 KH_2PO_4 , 3 NaNO_3 y 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y se incubaron a 25 °C durante 2 días. Para la determinación del peso seco, el micelio del hongo se recogió mediante filtración, se lavó dos veces con agua destilada y se secó en estufa a 40-50 °C hasta peso constante. Para determinar el contenido de lípidos, se molió el micelio seco hasta obtener un polvo fino en un homogeneizador de células y tejidos MP Bio FASTPREP®-24 y luego se extrajo con cloroformo/metanol (1:2), siguiendo a Folch et al. (1957). Después de la extracción, el solvente se eliminó por evaporación. La cantidad total de lípidos celulares (g/l) extraída de la biomasa seca se expresó como gramos de lípidos totales por litro de medio. La biomasa seca (g/l) se expresó como gramos de biomasa por litro de medio y el porcentaje de lípidos totales (%) se calculó como el contenido de lípidos por biomasa seca.

Análisis de lípidos totales en aislamientos seleccionados.

Los perfiles lipídicos de los aislamientos que mostraron una alta producción de lípidos en medio líquido se determinaron mediante cromatografía en capa fina (TLC): se aplicó un

extracto de cada hongo a una placa de gel de sílice poliéster Polygram SIL G 40 × 80 mm (Macherey–Nagel, Alemania) usando una mezcla de solventes (70 hexano, 30 éter etílico, 1 ácido acético) como fase móvil. El perfil lipídico se observó sumergiendo la placa en una solución de ácido sulfúrico en etanol al 5% y luego exponiendo la placa a 180 °C. Para la identificación de las bandas, los estándares utilizados fueron (Nu-Chek-Prep Inc. EE. UU.) alcohol estearílico (ROH), tripalmitato de glicerilo (TG), palmitato de colesterol (EE), colesterol (E), ácido palmítico (FFA), glicerilo dipalmitato (DG) y monopalmitato de glicerilo (MG). La cuantificación relativa de las bandas correspondientes a los lípidos individuales se realizó mediante densitometría, utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.).

Análisis de ácidos grasos de LPSc 521 con cromatografía gaseosa.

A partir de los resultados de obtenidos en el apartado anterior, se seleccionó el aislamiento LPSc 521 para la cuantificación de ácidos grasos libres (AGL) y los esterificados en triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y esteroides. La extracción de lípidos totales utilizando micelio como fuente se realizó siguiendo la técnica de Folch (cloroformo/metanol 2:1 v/v) (Folch et al. 1957). El extracto lipídico resultante se evaporó hasta sequedad en una atmósfera de gas nitrógeno. El extracto seco obtenido se saponificó utilizando una solución de hidróxido de potasio al 10% en metanol, para eliminar esteroides y otros lípidos insaponificables. El material insaponificable se eliminó con hexano. Posteriormente, la fase saponificada se acidificó con HCl para convertir los jabones potásicos de los ácidos grasos en FFA. Estos FFA finalmente se extrajeron usando hexano y se transformaron en ésteres metílicos usando BF₃/metanol al 10% a 80 °C durante 30 min. El estándar analítico utilizado fue Supelco® 37 Component FAME Mix. El porcentaje de cada área de cada pico se calculó con respecto al área de pico total del cromatograma y se usó el tiempo de retención del estándar para la identificación del compuesto.

Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular en medio sólido

Para evaluar el crecimiento fúngico y la actividad lipasa se inocularon discos de agar de 6 mm de diámetro de cada aislamiento puro en cajas de Petri 3 medios agarizados distintos: medio MEA (agar extracto de malta), medio agarizado que contenía, en g/l, 5

peptona, 1 KH_2PO_4 y 0,1 MgSO_4 , suplementado con una emulsión de aceite de oliva al 2% como inductor de la síntesis de lipasas, y un medio promotor de la síntesis de lípidos que contenía 80 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, 4 g de KH_2PO_4 , 3 g de NaNO_3 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 20 g de agar por litro de agua destilada, ajustado a pH 7, siguiendo el protocolo de Papanikolaou et al. (2004) modificado. El crecimiento fúngico se estimó midiendo el diámetro del micelio (cm) para cada tratamiento. Para analizar la actividad de la lipasa se utilizaron 3 medios con diferentes fuentes de carbono: Tween 20 o Tween 80 como única fuente de carbono, según Hankin & Anagnostakis (1975), y emulsión de 2% de aceite de oliva (Burkert et al. 2004). La actividad lipolítica con Tween 20 o Tween 80 se indicó de dos maneras: un precipitado visible de la sal de calcio formada por el ácido graso de la reacción de hidrólisis, o una zona de aclaramiento alrededor de la colonia debido a la degradación completa de la sal del ácido graso. El medio con 2% de aceite de oliva se preparó con rojo de fenol como indicador de pH, según Lee et al. (2015). La actividad de la lipasa en este medio estuvo indicada por un cambio en el color del medio: el indicador se volvió amarillo cuando el pH era ácido, debido a la liberación de ácidos grasos de la hidrólisis del aceite de oliva. La actividad enzimática se calculó como el cociente del radio del halo de precipitación/aclaramiento o el área de cambio de color debido al indicador de pH, y el radio de crecimiento (Colen et al. 2006).

Análisis del efecto de diferentes aditivos sobre la actividad lipasa en medio de cultivo líquido

Para evaluar la inducción de la actividad de la lipasa en aislamientos de *Umbelopsis* los ensayos se realizaron en un Erlenmeyers de 250 ml que contenían 100 ml de medio basal compuesto por (g/l) 2 glucosa, 5 peptona, 1 KH_2PO_4 y 0,1 MgSO_4 , suplementado con aceite de oliva al 2% (v/v), y aserrín de *Nothofagus sp.* o tierra forestal al 2% (p/v). La actividad de la lipasa extracelular se midió mediante análisis titrimétricos utilizando aceite de oliva (10%) como sustrato, se emulsionó con goma arábica (10% p/v) y CaCl_2 en buffer fosfato (pH 7,0) según Rigo et al. (2010), o análisis espectrofotométrico utilizando el sustrato específico éster de ácido 1,2-O-dilauril-rac-glicerol-3-glutárico-(6'-metilresorufina) (Wiener-Lab, Argentina) (Panteghini et al. 2001). El método titrimétrico se analizó mediante titulación con NaOH 0,1 M utilizando rojo fenol como indicador, según Kashmiri et al. (2006). El método espectrofotométrico implicó el agregado de 100 μl de sobrenadante libre de células, previamente centrifugado para separar la biomasa, 50 μl de tampón Tris-HCl 400 mM, pH

7.5, que contenía CaCl_2 10 mM, y 30 μl del reactivo colorimétrico. La absorción molar de la metil resorufina a 580 nm fue de 62.300 l/mol/cm. La reacción se leyó durante 24 h a 25 °C, en un lector de microplacas Multiskan™ SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La actividad de la lipasa extracelular se expresó en unidades por ml de medio (U/ml). Una "unidad de lipasa" (U) se definió como la cantidad de enzima que liberaba un μmol de sustrato por minuto en las condiciones especificadas.

Análisis estadístico de crecimiento, actividad de lipasa y producción de lípidos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se determinaron los valores medios y el error estándar. Los datos sobre el contenido de lípidos y la actividad de la lipasa se sometieron a un ANOVA unidireccional. Las diferencias detectadas por ANOVA se analizaron mediante la prueba de Tukey. Se examinó la normalidad de los datos (prueba de ShapiroWilks modificada, $\alpha = 0.05$) y la homocedasticidad (prueba de Levene, $\alpha = 0.05$). Se realizaron análisis no paramétricos cuando los conjuntos de datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$). Todos los análisis se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo et al. 2010). Las figuras se crearon con GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Resultados

Identificación de los aislamientos

Los aislamientos CIEFAPcc 681, CIEFAPcc 684 y CIEFAPcc 685 presentaron esporangiosporas globosas ramificadas, sin esporas, con gotas de aceite, micelio blanco adpreso en medio agar extracto de malta, como las descritas para *U. nana* (Mahoney et al. 2004). Los aislamientos CIEFAPcc 687, 688, 689 y 690 también presentaron esporangióforos ramificados, pero más largos que los aislamientos antes mencionados, esporangios globosos multiesporados y ausencia de clamidosporas. Estas características están asociadas con *U. changbaiensis* (Wang et al. 2022). Los aislamientos CIEFAPcc 691 y LPSc 36 presentaron esporangióforos ramificados, esporangios globosos con esporangiosporas multiangulares, clamidosporas que contienen gotas de aceite,, micelio adpreso de color blanco en medio agar extracto de malta. Los aislamientos CIEFAPcc 686, LPSc 520 y LPSc 521 presentaron grandes esporangióforos, no ramificado en CIEFAPcc 686 y ramificados simples en LPSc

520 y LPSc 521, esporangios multiesporados, esporas elipsoidales y columela presentes y micelio blanco adpreso. Todas las características y estructuras se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Características morfológicas de los hongos estudiados.

Número de colección	Características macroscópicas del cultivo	Características microscópicas
CIEFAPcc 681	Aéreo algodonoso blanco	Esporangióforo corto y ramificado. Esporangiola globosa con depósito de aceite.
CIEFAPcc 684	Aéreo algodonoso blanco	Esporangióforo corto y ramificado. Esporangiola globosa con depósito de aceite.
CIEFAPcc 685	Blanco algodonoso	Esporangiosporas cortas y ramificadas. Clamidosporas presentes. Esporangiola globosa con depósito de aceite.
CIEFAPcc 687	Primero blanco y luego algo rosado, no aéreo	Esporangióforo ramificado. Esporangios globosos con múltiples esporas
CIEFAPcc 688	Primero blanco y luego algo de rosa alrededor del inóculo	Esporangióforo ramificado. Esporangios globosos con múltiples esporas
CIEFAPcc 689	Blanco, no aéreo	Esporangióforo ramificado. Esporangios globosos con múltiples esporas
CIEFAPcc 690	Blanco, no aéreo	Esporangióforo ramificado. Esporangios globosos con múltiples esporas
CIEFAPcc 691	Blanco, adpreso	Esporangióforo simple y ramificado. Esporangios globosos y multiesporados. Esporas angulares
LPSc 36	Blanco, adpreso	Esporangióforo ramificado. Esporangios globosos con múltiples esporas. Esporangiosporas angulares
CIEFAPcc 686	Gris a rosado, adpreso	Esporangióforo grande y no ramificado. Esporangios globosos. Columela presente
LPSc 520	Blanco, adpreso	Esporangióforo simple y ramificado. Esporangios globosos y multiesporados. Esporangiosporas angulares
LPSc 521	Blanco, adpreso	Esporangióforo ramificado. Esporangios globosos y multiesporados. Esporangiosporas angulares

Identificación molecular

Para este estudio se generaron doce nuevas secuencias ITS y ocho nuevas LSU. El conjunto de datos ITS incluía 44 secuencias y 574 caracteres, incluidos los espacios. El mejor modelo para la sustitución de nucleótidos fue un modelo GTR + G + I. La desviación estándar promedio de las frecuencias divididas de BI fue 0.001519. Los análisis de ML y BI fueron congruentes. El árbol bayesiano para la región ITS con BPP ($\geq 90\%$) y MLB ($\geq 75\%$) se muestran en la Fig 15. Cuatro especies fueron identificadas: *Umbelospis changbaiensis* (CIEFAPcc 687, CIEFAPcc 688, CIEFAPcc 689, CIEFAPcc 690), agrupados dentro del clado

U. changbaiensis (MLB = 99, BP pvalor = 0,99); *Umbelopsis vinacea* (CIEFAPcc 691, LPSc 36), agrupada con el epítipo *U. vinacea* CBS 212.31 (MLB = 99, BP pvalor = 0,94), dentro del clado *U. changbaiensis* (MLB = 99, BP pvalor = 1); *Umbelopsis nana* (CIEFAPcc 681, CIEFAPcc 684, CIEFAPcc 685) agrupados dentro del complejo *U.nana/dimorpha* (MLB = 98, BP pvalor = 0,99); y *Umbelopsis ramaniana* (CIEFAPcc 686) y *Umbelopsis sp.* (LPSc 520, LPSc 521) (MLB = 96, BPpvalor = 0,92) agrupados dentro el clado *U. ramanniana*. LPSc 520 y LPSc 521 agrupados en un grupo fuertemente apoyado con *Umbelopsis* “*vinacea*” CBS 913.85 (raíz de *Picea abies* en la antigua Alemania Occidental) y *Umbelopsis sp.* SNW-2018d (MLB = 92, BPpvalor = 0,88) (Figura 1). El conjunto de datos combinado de ITS y LSU incluyó 33 colecciones de hongos y 931 caracteres, incluidos los gaps. El mejor modelo para la partición combinada ITS y LSU fue un modelo GTR+G+I. El árbol bayesiano con ambos BPP ($\geq 95\%$) y MLB ($\geq 75\%$) se muestran en la Fig 2. Los resultados de los análisis ML y Bayesianos fueron muy concordantes. El árbol bayesiano concatenados de ITS y LSU con BPP ($\geq 90\%$) y MLB ($\geq 75\%$) se muestra en la Fig 16. Se identificaron cuatro especies: *Umbelopsis changbaiensis* (CIEFAPcc 687, CIEFAPcc 689); *Umbelopsis vinacea* (LPSc 36) agrupada con el epítipo *U. vinacea* CBS 212.31 (MLB = 77, BPpvalor = –) dentro del clado *U. changbaiensis* (MLB = 96, BPpvalor = 0,99); *Umbelopsis nana* (CIEFAPcc 681, CIEFAPcc 684 y CIEFAPcc 685) agrupados en el clado del complejo *U.nana/dimorpha* (MLB = 100, BPpvalor = 0,95); y *Umbelopsis ramaniana* (CIEFAPcc 686) y *Umbelopsis sp.* (LPSc 520 y LPSc 521) (MLB = 99, BPpvalor = 0,97) agrupados dentro del clado *U. ramanniana*.

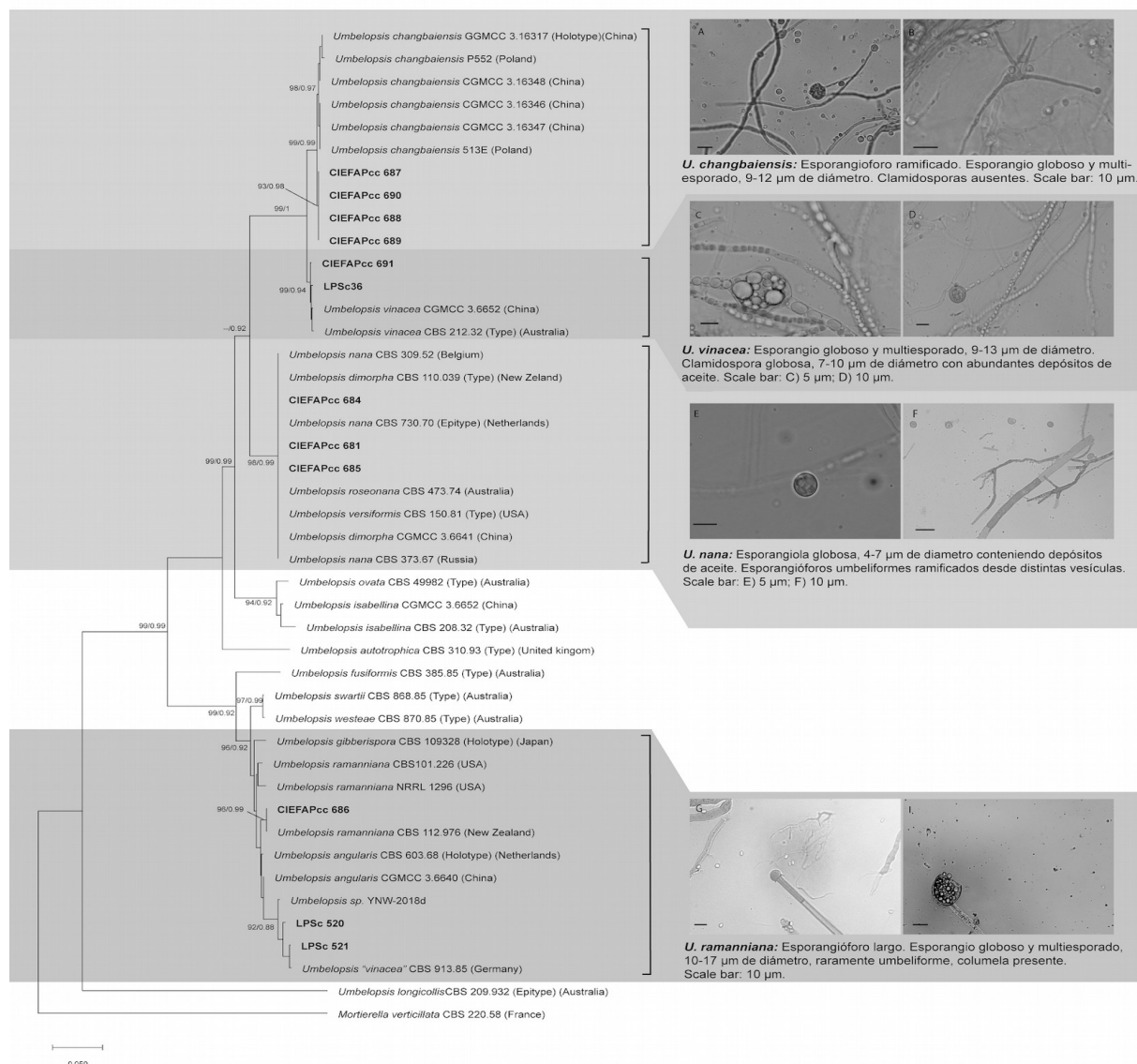


Fig 15. Posición filogenética de los aislamientos patagónicos analizados y otros pertenecientes a cepas de referencia con base en el conjunto de datos ITS, utilizando análisis de Máxima Verosimilitud y Bayesiano. No se indican valores de bootstrap inferiores al 75% ni valores de probabilidad posterior inferiores a 0,90. Outgroup: *Mortierella verticillata* CBS 220.68

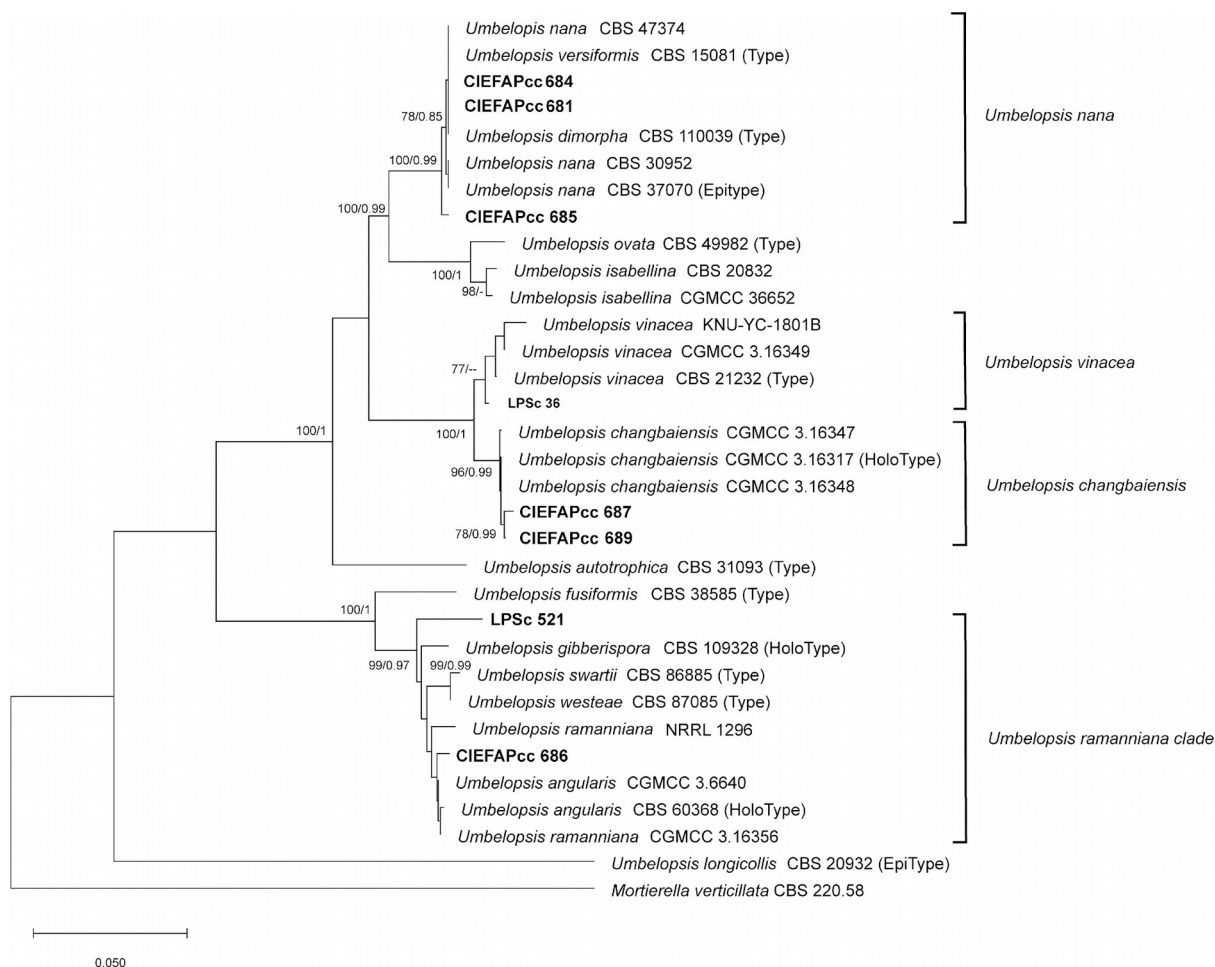


Fig 16. Posición filogenética de los aislamientos patagónicos analizados y otros pertenecientes a cepas de referencia según el conjunto de datos concatenados de ITS y LSU, utilizando análisis de Máxima Verosimilitud y Bayesiano. No se indican valores de bootstrap inferiores al 75% ni valores de probabilidad posterior inferiores a 0,90. Outgroup: *Mortierella verticillata* CBS 220.68

Análisis del crecimiento y producción de lípidos en medio sólido

Los datos sobre el crecimiento en cultivos de agar se muestran en la Tabla 10. De todos los aislamientos, LPSc 521 (*U. ramanniana*) mostró el mayor crecimiento en AEM (3,25 cm), mientras que el aislamiento CIEFAPcc 691 de *U. vinacea* presentó el menor crecimiento (1,83 cm, pvalor < 0,0001). En el medio promotor de lípidos con exceso de glucosa, el mayor crecimiento se observó en CIEFAPcc 681 de *U. nana* (2,63 cm) y el menor en CIEFAPcc 690 de *U. changbaiensis* (1,75 cm, pvalor = 0,0009).

Tabla 10. Valores de crecimiento de la colonia de los aislamientos en agar malta y en el medio inductor de lípidos.

Especie	Número de aislamiento	Medio Agar malta	Medio inductor de lípidos
<i>Umbleopsis nana</i>	CIEFAPcc 681	2.48± 0.29 ^{abcd}	2.63±0.13 ^e
	CIEFAPcc 684	2.65±0.13 ^{bcde}	1.95±0.13 ^{ab}
	CIEFAPcc 685	1.85±0.06 ^a	2.38±0.41 ^{bcde}
	CIEFAPcc 687	2.45± 0.06 ^{abc}	2.18±0.13 ^{abcd}
<i>Umbelopsis changbaiensis</i>	CIEFAPcc 688	2.30±0.22 ^{ab}	2.05±0.06 ^{abc}
	CIEFAPcc 689	2.93±0.05 ^{cde}	2.23±0.21 ^{bcde}
	CIEFAPcc 690	2.45±0.06 ^{abc}	1.75±0.13 ^a
<i>Umbelopsis vinacea</i>	CIEFAPcc 691	1.83±0.22 ^a	2.38±0.10 ^{cde}
	LPSc 36	2.95±0.06 ^{de}	2.48±0.28 ^{de}
	CIEFAPcc 686	2.55± 0.19 ^{abcd}	2.20±0.24 ^{abcd}
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	LPSc 520	3.00±0.08 ^{de}	2.30±0.22 ^{bcde}
	LPSc 521	3.25±0.13 ^e	2.55±0.10 ^{de}

Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado ± DE. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0,05) entre aislados para cada tratamiento. El crecimiento se calculó midiendo el radio de la colonia (cm) luego de 7 días de incubación

La acumulación de lípidos neutros en el micelio se observó al microscopio utilizando el colorante fluorescente BODIPY (Fig 17). Aunque los resultados son preliminares, después de 10 días el aislamiento LPSc 521 parecía contener lípidos cuya intensidad fluorescente era mayor que las de CIEFAPcc 681 y CIEFAPcc 689.

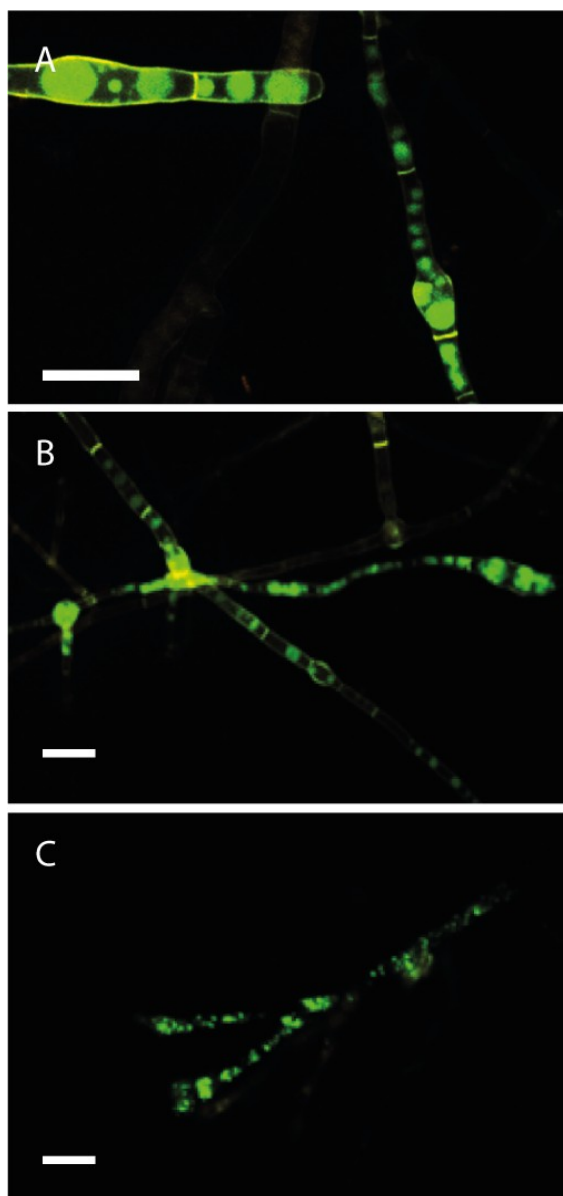


Fig 17. Estructuras diferenciadas por aislamientos seleccionados teñidos con tinte fluorescente BODIPY, vistas con el microscopio de epifluorescencia. A LPSc 521, B CIEFAPcc 681, CIEFAPcc 689

Crecimiento del hongo y producción de lípidos en medio líquido

Para la determinación de lípidos totales, se seleccionaron *U. ramanniana* LPSc 521, *U. nana* CIEFAPcc 681 y *U. changbaiensis* CIEFAPcc 689 debido a que mostraron las tasas de crecimiento más altas en la mayoría de los medios probados (Tabla 18). Los lípidos totales extraídos en diferentes tiempos de incubación se muestran en la Fig 10. LPSc 521 presentó la mayor biomasa y producción total de lípidos a las 288 h de incubación: 36.28 g/l y 16.40 g/l,

respectivamente. Para el aislamiento CIEFAPcc 681, la mayor producción de biomasa se observó a las 288 h de incubación (25.16 g/l), mientras que la mayor producción total de lípidos fue a las 240 h (10.60 g/l). La menor biomasa (10.16 g/l a 288 h de incubación) y producción de lípidos (3.56 g/l a 240 h de incubación) se observaron para *U. changbaiensis* CIEFAPcc 689. El porcentaje de producción de lípidos por masa seca fue similar para *U. nana* (34.01%) y *U. changbaiensis* (33.86%), pero la cantidad total de lípidos fue mayor para *U. nana* (4.32 g/l). El análisis cinético mostró una disminución de los lípidos totales después de la fase de crecimiento en *U. nana* y *U. changbaiensis*. Para el aislamiento LPSc 521, los lípidos aumentaron continuamente durante el período de incubación (Fig 18). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de producción de lípidos a las 240 h de incubación (valor de p -valor > 0.05).

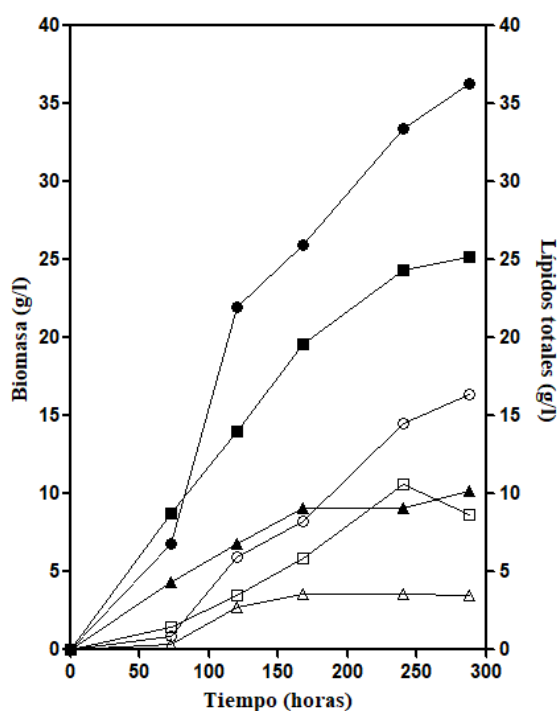


Fig 18. Evolución temporal de la biomasa (símbolos cerrados) de los aislados LPSc 521 (círculo), CIEFAPcc 681 (cuadrado) y CIEFAPcc 689 (triángulo) y sus lípidos (símbolos abiertos), creciendo en cultivo líquido. Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado.

Análisis de lípidos totales en los aislamientos seleccionados

Los triglicéridos (TG) fueron el tipo de lípidos más abundante en *U. ramanniana* LPSc 521, mientras que los más abundantes en *U. nana* CIEFAPcc 681 y *U. changbaiensis* CIEFAPcc 689 fueron los ácidos grasos insaturados libres (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de lípidos totales del análisis de bandas de TLC

	LPSc 521	CIEFAPcc 681	CIEFAPcc 689
Monoglicérido (MG)	1.13± 0.75	1.30± 0.00	0.77±0.03
Diglicérido (DG)	0.66± 0.43	0.51± 0.00	0.28±0.20
Triglicérido (TG)	36.67±5.79	29.25± 0.00	26.62±1.43
Esteroles (E)	22.26±2.46	26.53±0.00	29.10±1.23
Ácido graso insaturado libre I	4.21±0.60	1.90± 0.00	6.22±0.46
Ácido graso insaturado libre II	29.95±3.87	34.20± 0.00	33.90±1.18
Ácido graso saturado libre (FA)	0.96± 0.36	2.73±0.00	2.05±0.10
Ésteres de esteroles (EE)	4.1± 0.00	3.58± 0.00	2.61±0.84

Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado del porcentaje relativo de las áreas de la banda. Los valores CIEFAPcc 681 corresponden a una sola muestra.

Análisis de ácidos grasos de LPSc 521 con cromatografía gaseosa

Los ácidos grasos libres LPSc 521 se expresan en la Tabla 12, y los cromatogramas del análisis GC-FID se muestran en la Fig 19. El ácido γ -linolénico (6,9,12-C18:3) fue el ácido graso predominante. El ácido oleico (9-C18:1), el ácido palmítico (C16:0) y el ácido linoleico (9,12-C18:2) también se encontraron en altas concentraciones, mientras que el ácido esteárico (C18:0), el ácido mirístico (C14 :0), ácido palmitoleico (9-C16:1) y ácido α -linolénico (9,12,15-C18:3) se detectaron en concentraciones más bajas.

Tabla 12. Análisis GC-FID de los ésteres metílicos de ácidos grasos del aislamiento LPSc 521

N	Ácido graso	Tiempo de retención	área %
1	ácido láurico C12:0	2.7	0.2

2	ácido mirístico C14:0	4.3	2.2
3	ácido palmítico C16:0	6.9	18.0
4	ácido palmitoleico 9-C16:1 (n7)	7.3	2.0
5	ácido margárico C17:0	8.6	0.1
6	ácido esteárico C18:0	10.5	2.2
7	ácido oléico 9-C18:1 (n9)	10.9	24.6
8	ácido linoléico 9,12-C18:2 (n6)	11.9	17.6
9	ácido γ -linolénico 6,9,12-C18:3 (n6)	12.5	30.6
10	ácido α -linolénico 9,12,15-C18:3 (n3)	13.2	1.1
11	ácido araquidónico C20:0	14.8	0.2
12	ácido gadolénico C20:1	15.2	0.3

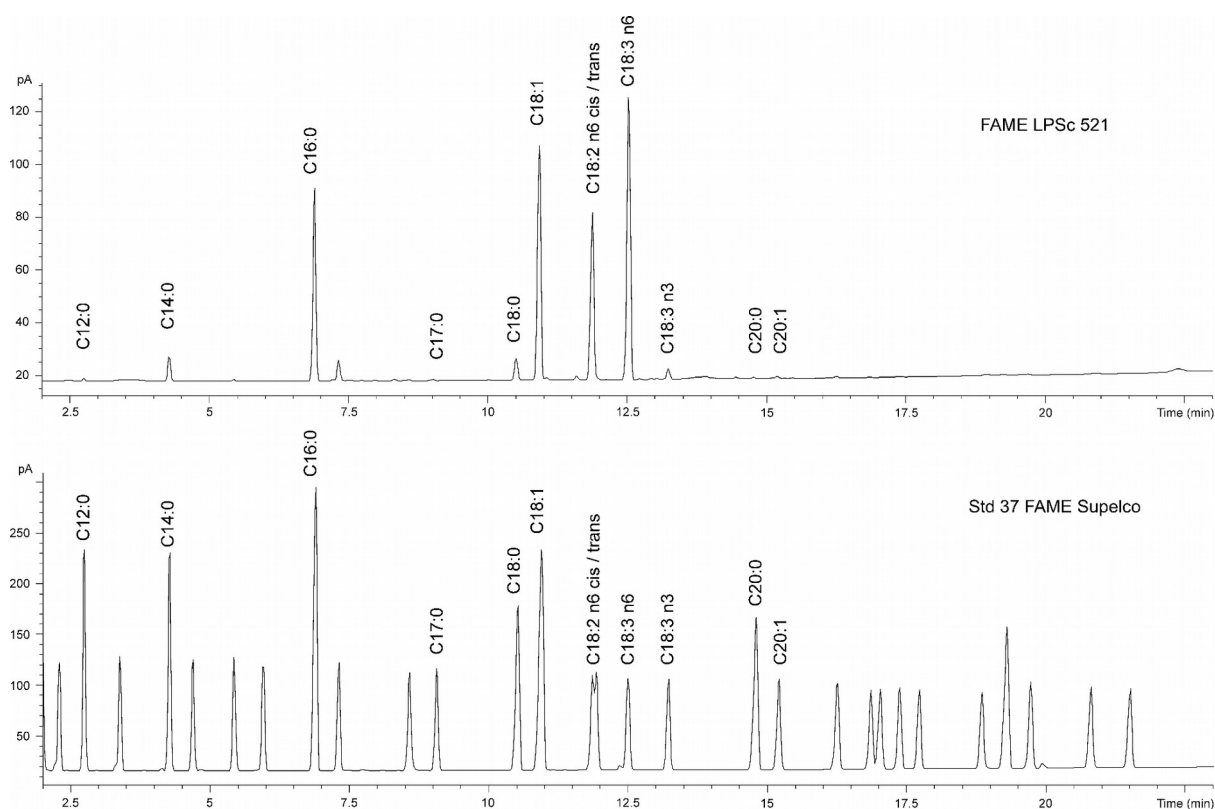


Fig 19. Análisis GC-FID (cromatografía de gases – detector de ionización de llama) que muestra picos de ácidos grasos del aislamiento LPSc 521.

Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular en medio sólido

Los datos sobre el crecimiento en cultivo agarizado se muestran en la Tabla 13. En medio aceite de oliva, el mayor crecimiento también se encontró para el aislamiento LPSc 521 (2,05 cm), y el menor para el aislamiento CIEFAPcc 690 de *U. changbaiensis* (1.14 cm; valor de p valor = 0.0001). En los medios que contenían Tween 20 y Tween 80, el nivel de actividad más alto se encontró para CIEFAPcc 686 de *U. ramanniana* (2.82 y 2.29 cm respectivamente), y el más bajo fue para CIEFAPcc 684 de *U. nana* (1.38 y 1.10 cm, p valor < 0.0001). En Tween 20, LPSc 520 y LPSc 521, los aislamientos no mostraron actividad. La actividad de las especies con sustrato de Tween se muestra en la Fig 20. En el medio aceite de oliva, LPSc 521 mostró el mayor nivel de actividad (1.83 cm) mientras que CIEFAPcc 689 de *U. changbaiensis* presentó el menor (1.19 cm; p valor = 0.0263).

Tabla 13. Actividad lipasa en medios sólidos.

Especie	Número de aislamiento	Tween 20	Tween 80	Medio con aceite de oliva
<i>Umbelopsis nana</i>	CIEFAPcc 681	1.67 ± 0.05 ^{ab}	1.39 ± 0.02 ^{abc}	1.15 ± 0.08 ^{ab}
	CIEFAPcc 684	2.33 ± 0.18 ^c	1.91 ± 0.14 ^c	1.20 ± 0.14 ^{abc}
	CIEFAPcc 685	1.38 ± 0.15 ^a	1.10 ± 0.01 ^a	1.27 ± 0.05 ^{abc}
	CIEFAPcc 687	2.00 ± 0.08 ^{bc}	1.72 ± 0.20 ^{bc}	1.12 ± 0.08 ^{ab}
<i>Umbelopsis changbaiensis</i>	CIEFAPcc 688	2.13 ± 0.16 ^{bc}	1.32 ± 0.09 ^{ab}	1.11 ± 0.05 ^{ab}
	CIEFAPcc 689	1.96 ± 0.10 ^{abc}	1.45 ± 0.40 ^c	1.09 ± 0.04 ^a
	CIEFAPcc 690	1.97 ± 0.14 ^{bc}	1.40 ± 0.11 ^{abc}	1.36 ± 0.09 ^{bc}
<i>Umbelopsis vinacea</i>	CIEFAPcc 691	2.12 ± 0.04 ^{bc}	1.75 ± 0.24 ^c	1.25 ± 0.07 ^{abc}
	LPSc 36	1.89 ± 0.30 ^{bc}	1.35 ± 0.13 ^{abc}	1.30 ± 0.11 ^{abc}
	CIEFAPcc 686	2.82 ± 0.26 ^d	2.29 ± 0.42 ^d	1.33 ± 0.20 ^{abc}
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	LPSc 520	N/D	1.11 ± 0.01 ^a	1.49 ± 0.30 ^{bc}
	LPSc 521	N/D	1.12 ± 0.02 ^a	1.83 ± 0.09 ^c

Los datos representan valores medios de experimentos por triplicado ± DE. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (p valor < 0.05) entre aislados para cada tratamiento. La actividad enzimática se calculó como el cociente del halo hidrolítico (en cm) y el radio de crecimiento (en cm). Abreviatura: N/D: actividad no detectada

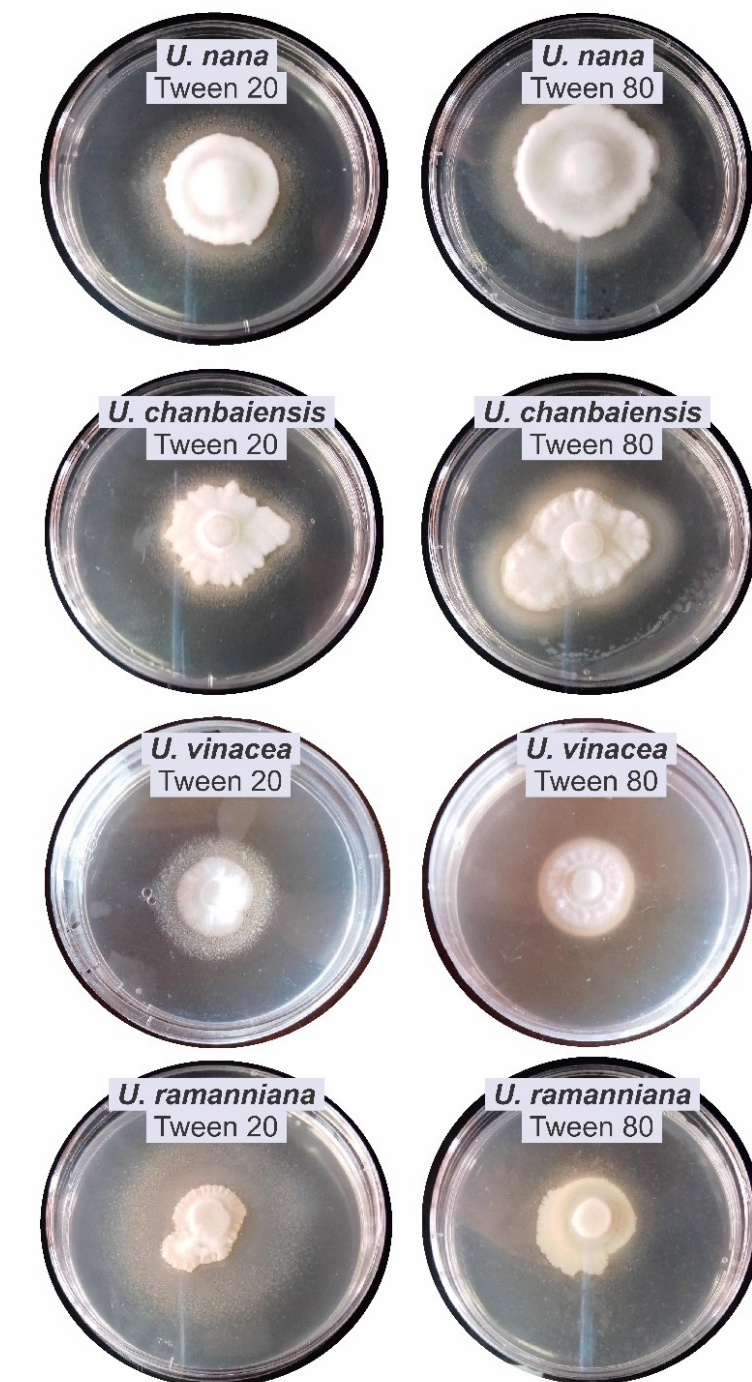


Fig 20. Actividad lipasa en medio sólido con Tween 20 y Tween 80 de los aislamientos CIEFAPcc 684 (*U. nana*), CIEFAPcc 687 (*U. changbaiensis*), CIEFAPcc 691 (*U. vinacea*) y CIEFAPcc 686 (*U. ramanniana*).

Análisis del efecto de diferentes aditivos sobre la actividad lipasa en medio de cultivo líquido

Utilizando el método espectrofotométrico, la actividad lipasa de CIEFAPcc 686 (*U. ramanniana*) fue significativamente mayor que la de los demás aislamientos analizados cuando se cultivaron con aceite de oliva (valor p valor = 0.0398) y aserrín de *Nothofagus* (valor p valor = 0.0493). Utilizando el mismo método, el aislamiento LPSc 520 (*U. ramanniana*) mostró altos niveles de actividad cuando se cultivó con suelo de bosque de *Nothofagus* como aditivo medio (1.438 U/l; valor de p valor = 0.0293). En el método titrimétrico, el aislamiento CIEFAPcc 691 (*U. vinacea*) mostró el mayor nivel de actividad en la presencia de aceite de oliva (0.090 U/ml; valor de p valor = 0.0317), mientras que el aislamiento LPSc 521 (*U. ramanniana*) presentó el nivel más alto para aserrín de *Nothofagus* (0.113 U/ml; valor de p valor = 0.0230). No hubo diferencias estadísticas entre los aislamientos en medio suplementado con suelo de *Nothofagus* (valor p valor = 0.0944), pero el mayor nivel de actividad se observó para CIEFAPcc 686 *U. ramanniana* (0.061 U/ml), y el más bajo para LPSc 520 (0.012 U/ml). Todos los valores se muestran en la Fig 21. Analizado a nivel de especie, el método espectrofotométrico reveló que los aislamientos pertenecientes a *U. ramanniana* tuvieron la actividad lipolítica más alta en todos los medios de inducción, mientras que los de *U. nana* tuvieron la más baja. La Fig 22 representa el curso temporal de la actividad enzimática. Observamos que los aislamientos de todas las especies aumentaron su actividad con el tiempo. Se observaron altos niveles de actividad utilizando aceite de oliva como inductor, observándose el máximo a los 12 días para *U. ramanniana*. El aserrín de *Nothofagus* mostró la menor actividad inductora; en este medio *U. vinacea* aumentó su actividad a los 6 días y luego disminuyó a los 12 días. La Tabla 14 muestra los valores medios de actividad de lipasa encontrados para cada especie hacia el final del tiempo de cultivo.

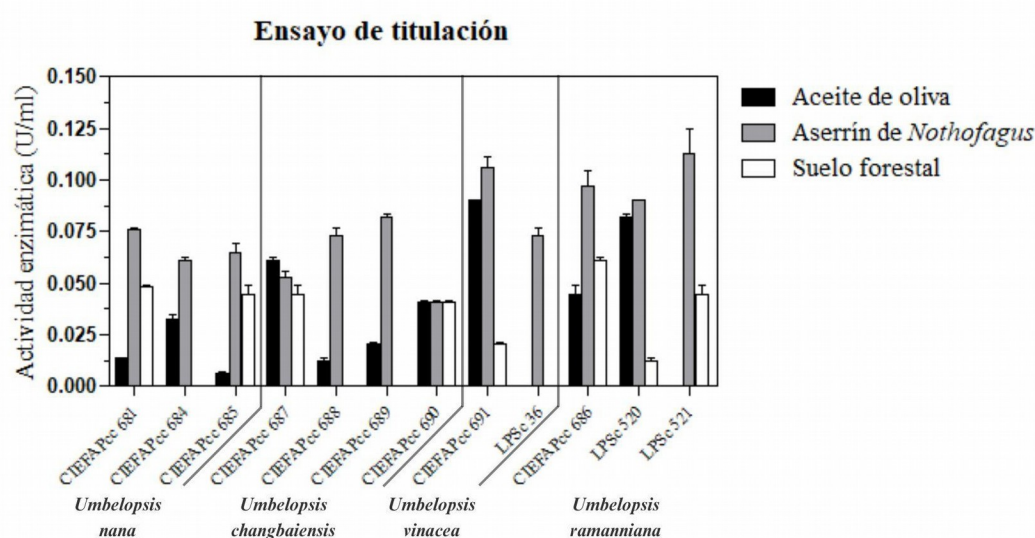
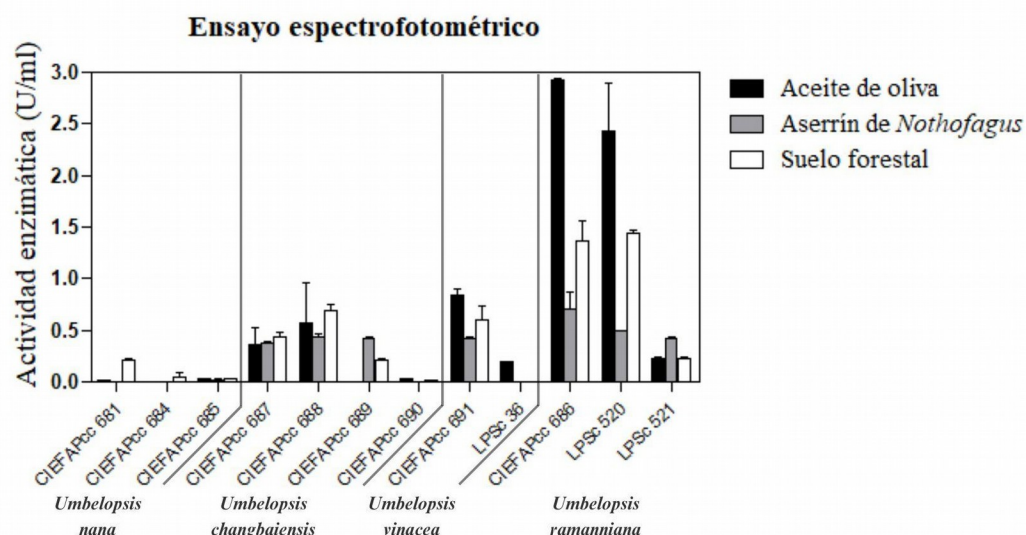


Fig 21. Valores medios de actividad lipasa de todos los aislados en cultivo líquido, utilizando dos métodos de detección (espectrofotométrico y titrimétrico), a los 12 días de incubación en diferentes fuentes de C. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0,05) entre cepas para cada tratamiento.

Tabla 14. Actividad de lipasa resumida por especies.

Especies	Actividad lipasa					
	Ensayo espectrofotométrico			Ensayo titrimétrico		
	Aceite de oliva	Aserrín de <i>Nothofagus</i>	Suelo de <i>Nothofagus</i>	Aceite de oliva	Aserrín de <i>Nothofagus</i>	Suelo de <i>Nothofagus</i>
<i>Umbelopsis nana</i>	0.025 ± 0.006 ^a	0.023 ± 0.005 ^a	0.120 ± 0.104 ^a	0.018 ± 0.012 ^a	0.067 ± 0.007 ^{ab}	0.046 ± 0.004
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	2.245 ± 1.336 ^b	0.540 ± 0.168 ^b	1.010 ± 0.624 ^b	0.063 ± 0.022 ^{bc}	0.100 ± 0.014 ^c	0.039 ± 0.023
<i>Umbelopsis changbaiensis</i>	0.306 ± 0.191 ^{ab}	0.309 ± 0.193 ^a	0.342 ± 0.274 ^{ab}	0.034 ± 0.020 ^{ab}	0.062 ± 0.017 ^a	0.043 ± 0.004
<i>Umbelopsis vinacea</i>	0.518 ± 0.378 ^b	0.425 ± 0.013 ^{ab}	0.609 ± 0.187 ^{ab}	0.090 ± 0.000 ^c	0.089 ± 0.019 ^{bc}	0.020 ± 0.001

Los datos representan valores medios ± DE. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0,05) entre cepas para cada tratamiento. *Valor expresado en U/l. ** Valor expresado en U/ml

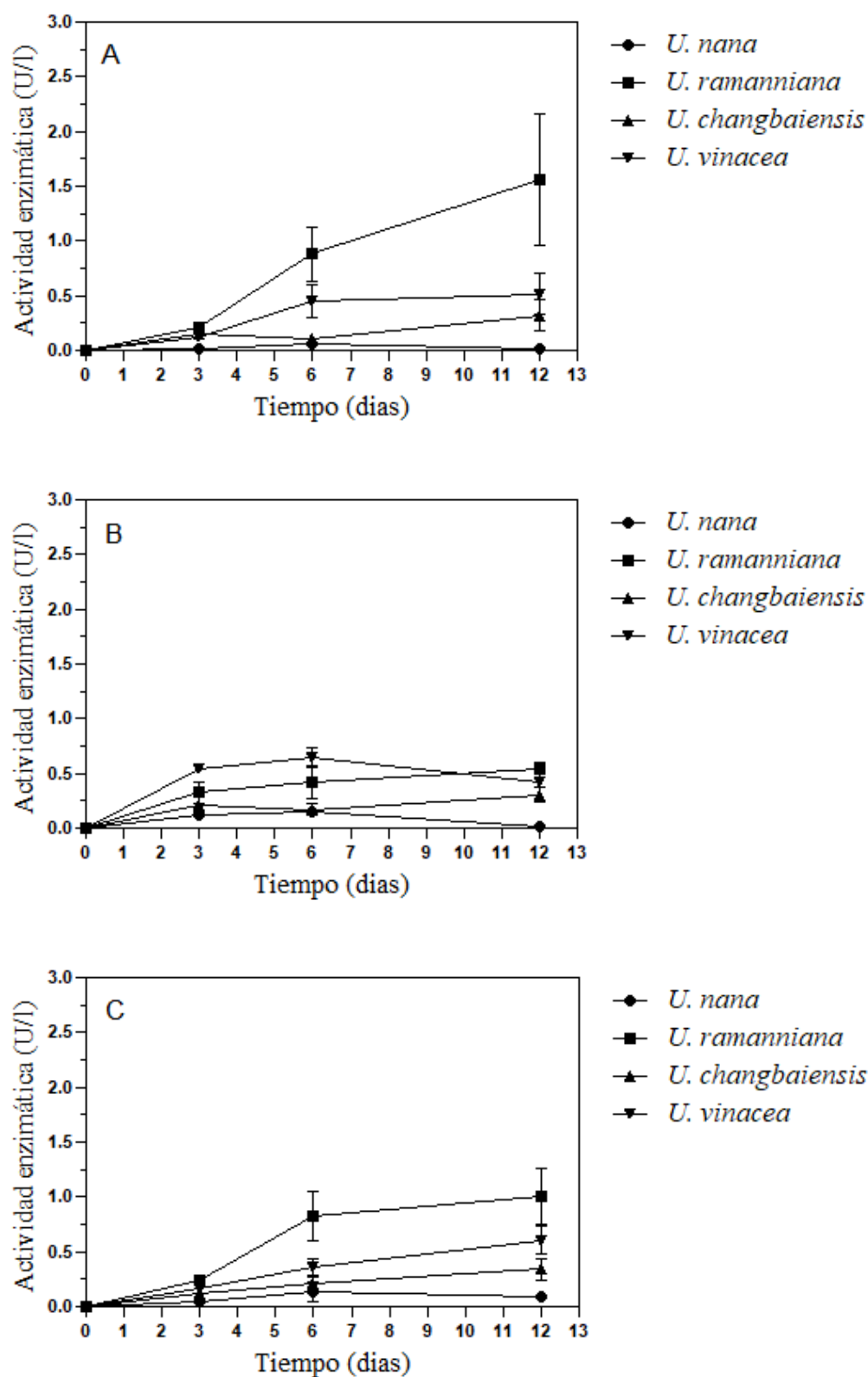


Fig 22. Evolución temporal de la actividad de la lipasa extracelular en cultivo líquido con diferentes suplementos: **A)** Sustrato de aceite de oliva, **B)** Sustrato de aserrín de *Nothofagus*, **C)** Sustrato de suelo forestal de *Nothofagus*. Los datos representan valores medios $\pm$ DE de todos los experimentos.

Discusión

Identificación de los aislamientos

Se identificaron morfológica y filogenéticamente los aislamientos de *Umbelopsis* asociados a bosques patagónicos de *Nothofagus* corresponden a cuatro especies. Los aislamientos CIEFAPcc 681, CIEFAPcc 684 y CIEFAPcc 685 se determinaron como *U. nana*, presentando esporangios globosos ramificados sin esporas en colonias blancas cultivadas en agar extracto de malta, tal como se describe en Wang et al. (2015). Los aislamientos CIEFAPcc 687, 688, 689 y 690 se identificaron como *U. changbaiensis* basándose en la filogenia y características microscópicas como el tamaño de los esporangióforos y la ausencia de clamidosporas. Esto último se considera esencial para la diferenciación de esta especie de *U. vinacea*, donde hay clamidosporas presentes (Wang et al. 2014). Los aislamientos CIEFAPcc 686, CIEFAPcc 691, LPSc 36, LPSc 520 y LPSc 521 producen más esporangiosporas angulares que *U. changbaiensis* y también clamidosporas. En el análisis filogenético, los aislamientos CIEFAPcc 691 y LPSc 36 se incluyeron dentro del clado *U. vinacea* y también presentaron características morfológicas acordes con la descripción de esta especie (esporangios globosos, multiesporados con esporas angulares, clamidosporas con gotas de aceite). CIEFAPcc 686, LPSc 520 y LPSc 521 estaban morfológicamente (esporangióforo grande, esporas elipsoidales y columela presentes) y filogenéticamente relacionados con *U. ramanniana*. LPSc 520 y LPSc 521, previamente identificados morfológicamente como *Mortierella vinacea* por Cabello (1997), y mostraron algunas diferencias morfológicas con respecto a la descripción de *U. ramanniana* (esporangióforo grande, esporas elipsoidales). Asimismo, estos aislamientos agrupados con la secuencia de *Umbelopsis* sp. CBS 913.85 (Walther et al. 2013) y *Umbelopsis* sp. YNW-2018d en un grupo bien respaldado en conjuntos de datos ITS y LSU. Sugerimos que se requiere una revisión taxonómica de *U. ramanniana*, con análisis del clado, tipo de material y un conjunto de datos filogenéticos más completo con más loci, como MCM7, SSU, TEF1a y ACT, y muchas especies de *Umbelopsis* así como *Mortierella* (Owaga et al. 2005, Owaga et al. 2011, Wang et al. 2014)

Análisis de lípidos totales en los aislamientos seleccionados

Según Murphy (1991), tener una cantidad de lípidos totales superior al 39% de contenido de micelio seco (más del 25% p/p) permite que una cepa se califique como un

productor microbiano de lípidos prometedor. El contenido máximo de lípidos totales miceliales se alcanzó en una etapa en la que se había producido el crecimiento máximo en el aislamiento LPSc 521 (43% p/p de biomasa seca). En *U. nana* CIEFAPcc 861 y *U. changbaiensis* CIEFAPcc 689 esto ocurrió antes del crecimiento máximo (31% y 34% p/p de biomasa seca respectivamente), disminuyendo el contenido de lípidos totales del micelio al final del ensayo. Esto podría deberse a que estos lípidos se estaban utilizando como fuente de carbono, una situación típica de la gluconeogénesis en los hongos (Hynes 2010, Keyhani 2018). Analizando las fracciones de glicéridos y ácidos grasos ácidos, podemos hacer una comparación de los niveles de producción obtenidos por otras cepas de *Umbelopsis*. El aislamiento LPSc 521 mostró 12.06 g/l y CIEFAPcc 681 de *U. nana* produjo 7.40 g/l de ácidos grasos, ambos valores superiores a los obtenidos por Kosa et al. (2018) para la cepa de *U. vinacea* CCM F-539 (7,9 g/l) y Buráňová et al. (1990) para la cepa CCF 1103 de *U. nana* (2,3 g/l), respectivamente. Aunque se ha sugerido que la producción de aceites celulares por hongos oleaginosos es valiosa para diferentes procesos biotecnológicos, como la industria del biodiesel, los procesos industriales todavía se limitan a la producción únicamente de aceites de ácidos grasos poliinsaturados de alto valor, como los ácidos γ linoleico y araquidónico. (Dzurendova et al.2020). En un análisis tecnoeconómico de la producción de biodiesel a partir de lípidos microbianos, se encontró que la glucosa utilizada como fuente de carbono podría representar el 80% del costo (Koutinas et al. 2014). Las fuentes de carbono de bajo costo, como los residuos agrícolas y forestales, podrían ser una alternativa sostenible a la glucosa (Gardeli et al. 2017; Economou et al. 2011; Zheng et al. 2012; Patel et al. 2016). Este significativo resultado observado para el aislamiento LPSc 521 debe complementarse con la evaluación de los diferentes residuos orgánicos y condiciones disponibles, la determinación de parámetros de crecimiento óptimos para la máxima producción de lípidos y la diferenciación de ácidos grasos en diferentes condiciones, como bajas temperaturas.

Análisis de ácidos grasos de LPSc por cromatografía gaseosa

Los perfiles de ácidos grasos obtenidos fueron en su mayoría comparables con los datos derivados de la literatura. El ácido γ -linolénico (6,9,12-C18:3), el ácido oleico (9-C18:1), el ácido palmítico (C16:0) y el ácido linoleico (9,12-C18:2) fueron los ácidos grasos más importantes producidos por LPSc 521. Estos resultados concuerdan con el perfil lipídico total, mostrando una gran cantidad de ácidos grasos libres saturados e insaturados. Sin

embargo, los cambios en las condiciones de cultivo podrían dar como resultado composiciones significativas de ácidos grasos poliinsaturados (Hansson & Dostalek 1988, Fakas et al. 2009). Como es bien sabido, la acumulación de lípidos en la biomasa fúngica depende de las condiciones de cultivo, incluidos los valores de pH y temperatura, así como de la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno (Ochsenreither et al. 2016). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo son consistentes con otros informes para aislamientos de Zigomycetes. Aunque en otros trabajos se observaron los mismos ácidos grasos, sus proporciones son ligeramente diferentes a las encontradas por nosotros. Kosa et al. (2018) obtuvieron para *U. ramanniana* entre un 47% y un 54% de ácido oleico, entre un 14% y un 18% de ácido linoleico, entre un 15% y un 17% de ácido palmítico y solo entre un 7% y un 9% de ácido γ -linolénico. Grantina-Ievina et al. (2014) informaron para otro aislamiento de *U. ramanniana* 42% de ácido oleico, 13% de ácido linolénico, 27% de ácido palmítico y 10% de ácido γ -linolénico. En nuestro trabajo hemos encontrado también ácido oleico (26.4%), ácido linoleico (17.6%), ácido palmítico (18%) y ácido γ -linolénico (30.6%) como los ácidos grasos mayoritarios. Sin embargo, se encontró una mayor proporción de ácido γ -linolénico en comparación con los otros ácidos grasos principales. Estos resultados pueden deberse a varias causas. Por un lado, es posible que los aislamientos pertenecientes al complejo *U. ramanniana* muestren una notoria variabilidad intraespecífica. Además, podría deberse a la existencia de un flujo diferencial de precursores en la ruta de síntesis de ácidos grasos asociado a diferencias en la actividad relativa de las desaturasas implicadas en esta ruta. Es bien reconocido que los cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil de ácidos grasos insaturados son el resultado de alteraciones en la expresión y actividad de las desaturasas de ácidos grasos (Czumaj & Śledziński 2020). En este sentido, los ácidos grasos insaturados pueden operar como inhibidores competitivos frente a desaturasas específicas (Lee et al. 2016), lo que puede estar condicionado a su vez por las condiciones de cultivo impuestas en este trabajo. La acumulación de ácido γ -linolénico en la biomasa fúngica normalmente se asocia con la fase de crecimiento exponencial (Klempova et al. 2013). Además, la producción de ácido γ -linolénico está relacionada con la producción total de ácidos grasos (Kennedy et al. 1993) las bajas temperaturas como las que prevalecen en el hábitat de aislamiento de estos hongos podrían haber propiciado la selección de fenotipos, modulando la composición de sus lípidos para contrarrestar la disminución de la fluidez de la membrana y adaptarse a las bajas temperaturas (Robinson 2001, Hassan et al. 2016, Russell 2008). Además, los Zigomycetes acumulan lípidos como reservas de carbono, principalmente en esporas asexuales y zigosporas (Khunyoshyeng et al. 2002, Grantina-Ievina et al. 2014).

El alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en los aislamientos de *Umbelopsis* patagónicos puede ser indicativo de su metabolismo, probablemente adaptado al frío.

Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasas extracelular en medio sólido y en medio líquido utilizando diferentes aditivos

Analizamos la capacidad de los aislamientos de *Umbelopsis* patagónicos para sintetizar enzimas con actividad lipasa en diferentes condiciones de sustrato. Utilizamos agar y medios líquidos que contienen sustratos lipídicos y aditivos relacionados con la fuente del aislamiento. En Tween 20 y 80, *U. ramanniana* CIEFAPcc 686 mostró los niveles más altos de actividad de lipasa, incluso superiores a LPSc 520 y 521, que pertenecen a la misma especie. LPSc 520 y 521 no mostraron actividad lipolítica cuando el sustrato contenía monolaurato (Tween 20). Este comportamiento diferencial de LPSc 520 y 521 en función del tipo de medio Tween podría deberse, al menos en parte, a las propiedades intrínsecas de cada uno de estos detergentes no iónicos, como su concentración micelar crítica (CMC). También puede estar condicionado por la concentración de Tween utilizada en el medio y la temperatura de incubación ya que en soluciones acuosas los tween forman dos fases (Salameh & Wiegel 2007). Además, la actividad y estabilidad de las lipasas fúngicas pueden verse afectadas por las propiedades tensioactivas (tensión superficial) de los detergentes, ya que sus interacciones con las lipasas pueden ser complejas e impredecibles (Salameh y Wiegel 2007). Dado que la concentración de Tween (1% v/v) y la temperatura de incubación (24 °C) fueron constantes en nuestro ensayo, la CMC más alta encontrada para Tween 20 que para Tween 80 puede explicar los resultados obtenidos. Los detergentes pueden activar las lipasas en concentraciones premicelar, por debajo de sus niveles de CMC, donde no hay micelas, y aumentar la actividad alrededor del punto CMC. Por lo tanto, aunque el valor de CMC de Tween 20 es mayor que el de Tween 80, la gran diferencia entre ambos y la concentración real disponible en el medio puede haber dificultado la detección de actividad lipolítica en medio agar Tween 20, pero no en Tween 80. Estudios anteriores han demostrado que los detergentes o materiales a base de aceite afectan significativamente la producción de lipasa (Gaspar et al. 1999; Wang et al. 2008, Híreš et al. 2018). Varios informes sobre la producción de lipasas fúngicas indican que el rendimiento de la enzima y su actividad se han visto influenciados de manera diferente por varios tipos de sustratos, incluidos los detergentes tipo Tween (Liu et al. 2000, Iftikhar et al. 2011). No existen estudios de este tipo en

representantes de *Umbelopsis*, por lo que sería interesante investigar si la actividad diferencial de los aislamientos que pertenecen a especies específicas de *Umbelopsis* sobre sustratos lipídicos en cultivos de agar se debe a la presencia de isoenzimas particulares y/o a otros factores específicos de la cepa. Vongsangnak et al. (2013) caracterizaron múltiples isoenzimas de lipasa en *Mortierella alpina* y *Mucor circinelloides*. Por otro lado, utilizamos un sustrato cromogénico, un éster de resorufina, para detectar la actividad de la lipasa (Panteghini et al. 2001). Este sustrato se usa ampliamente para la determinación de la actividad de la lipasa en suero humano y también se ha aplicado en estudios de investigación sobre estas enzimas en bacterias y hongos (Chemnitius et al. 1992) y plantas (Ncube et al. 1993). Para comparar este método espectrofotométrico para Mucoromycota, empleamos un método de referencia, la titulación, utilizando NaOH y rojo fenol, y aceite de oliva como sustrato. Mirza et al. (1982) informan 0.76 U/ml en *Mucor hiemalis*, así como Naqvi et al. (2011) 44.56 U/ml en *Mucor geophyllus*, valores superiores a los obtenidos en este trabajo. En especies de *Umbelopsis*, Kotogán et al. (2014) reportan 2.8 U/ml en *U. autotrophica*, 8.0 U/ml en *U. isabellina* y 3.1 U/ml para *U. ramanniana* usando aceite de oliva como inductor y midiendo colorimétricamente usando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato. Los triglicéridos de cadena larga son los sustratos naturales de las lipasas, con muy baja solubilidad en agua; y la reacción se cataliza en la interfaz lípido-agua, donde los 3 enlaces son generalmente hidrolizables. En este caso, la metodología de medición es diferente a la utilizada en nuestro trabajo, por lo que se debe tener cuidado al realizar una comparación de la actividad. También intentamos aumentar los niveles de enzimas lipolíticas cultivando los hongos en medios líquidos que contienen compuestos específicos como el aceite de oliva, reportado como un excelente inductor de lipasa (Wang et al. 2008; Treichel et al. 2010), y otras sustancias relacionadas con la fuente aislada (aserrín y tierra de *Nothofagus*). En este sentido, podría existir una relación entre las fuentes de aislamiento de los hongos y sus rutas metabólicas. Se sabe que los ácidos grasos, los alcoholes alifáticos de cadena larga y los esteroides son compuestos dominantes disponibles en la fracción lipófila de los extractos de madera (Neto et al. 2006). En el suelo, los compuestos lipófilos de la capa de hojarasca también están compuestos por una amplia gama de diferentes ácidos grasos, diterpenoides y triterpenoides (Stark et al. 2012). Hasta el momento no existe una caracterización específica de los suelos y las sustancias extractivas de madera de *Nothofagus*. Se encontraron algunas diferencias entre el nivel de actividad de *U. vinacea* y/o *U. ramanniana* y el nivel de cultivos de *U. nana*, que muestra el nivel de actividad más bajo. Cuando la actividad de la lipasa se determinó espectrofotométricamente, *Umbelopsis changbaiensis* mostró niveles similares a

los de *U. nana* cuando se cultivó en aceite de oliva y medio enmienda del suelo. Además, los niveles de actividad de *U. nana* y *U. changbaiensis* difirieron según el aislamiento utilizado, el tipo de medio y la metodología utilizada. Aunque el medio suplementado con aserrín de *Nothofagus* y/o tierra mejoró la actividad de la lipasa en *U. nana*, el aceite de oliva fue el mejor aditivo lipídico para los aislamientos estudiados, como se informó para varios organismos lipolíticos (Gaspar et al.1999, Ellaiah et al. 2004, Treichel et al. 2010). La actividad lipasa de los aislamientos LPSc 520 y 521 de *U. rammaniana* aumentó significativamente en medio de aceite de oliva. Plou et al. (1998) informaron que la baja correlación encontrada entre la hidrólisis de Tween 80 y el aceite de oliva por lipasas fúngicas se debe a que la enzima puede ser más específica de los glicéridos con ácidos monoinsaturados como el oleico o palmítico, particularmente abundantes en el aceite de oliva. Por lo tanto, intentamos analizar la inducibilidad de la lipasa utilizando sustratos del lugar donde se aislaron los hongos, como residuos de madera de *Nothofagus* y su suelo forestal. En cuanto a la metodología de medición, se pueden aplicar ensayos tanto espectrofotométricos como titrimétricos para el análisis de la actividad lipolítica en *Umbelopsis*. Como se informó en Beisson et al. (2000), la detección de la actividad lipasa utilizando éster de resorufina se logró después de probar diferentes tipos de buffers y concentraciones de calcio, ya que este sustrato es pobremente hidrolizado por muchas lipasas. Por otro lado, el método de titulación requiere más tiempo y, como informaron Hasan et al. (2009), podría ser propenso a errores debido a una titulación incompleta; sin embargo, sirve como método de referencia. Aunque tanto los ensayos colorimétricos como los titrimétricos se basan en la cuantificación de los productos de la lipólisis, el método espectrofotométrico podría considerarse más directo, ya que utiliza la detección de un cromóforo específico de la reacción catalizada por la lipasa, que se deriva de la hidrólisis de un único éster. vínculo. Sin embargo, en el método de titulación la actividad se estima a partir de la acidificación de la mezcla de reacción mediante la liberación de ácidos grasos libres de triglicéridos de cadena larga como el aceite de oliva, que presenta 3 enlaces potencialmente hidrolizables por molécula de sustrato. Por lo tanto, los altos valores de actividad lipasa obtenidos de los sobrenadantes de cultivos en medios que contienen aditivos derivados de *Nothofagus* y utilizando el método titrimétrico deben estudiarse en detalle, ya que otras fuentes ácidas de estos sustratos complejos contribuyen a los valores netos de pH de las reacciones (Romanya et al. 2005).. Se deben realizar estudios futuros para optimizar los parámetros de evaluación de la actividad de la lipasa en estos aislamientos, incluido el tiempo de reacción, la especificidad del sustrato, entre otros factores. Los aislamientos LPSc 520 y 521 tomados del

extremo sur de la Patagonia podrían ser fuentes prometedoras de lipasas debido a que mostraron cierta actividad lipolítica en aceite de oliva y/o Tween 80 en las mismas condiciones de cultivo, y también un comportamiento diferencial entre todos los aislamientos pertenecientes al clado *U. ramanniana*.

Conclusiones

Se identificaron doce aislamientos del género *Umbelopsis* asociados al bosque patagónico de *Nothofagus* utilizando criterios morfológicos y filogenéticos. Se evaluó la capacidad de estos aislamientos para sintetizar enzimas con actividad lipasa extracelular, siendo los aislamientos CIEFAPcc 686 y LPSc 521 pertenecientes al complejo *Umbelopsis ramanniana*, los que mostraron comportamientos diferenciales en cuanto a la síntesis de enzimas con actividad lipolítica: esto dependió del sustrato, incluidos los que contienen madera y suelo, y las condiciones de cultivo empleadas.

También se analizó el perfil lipídico de los aislamientos LPSc 521 (*U. ramanniana*), CIEFAPcc 681 (*U. nana*) y CIEFAPcc 689 (*U. changbaiensis*) presentando gran cantidad de ácidos grasos insaturados y triglicéridos, esperados para este grupo de hongos. Dado que LPSc 521 fue aislado de Tierra del Fuego, la región más fría de Argentina, su incapacidad para sintetizar lipasas en Tween 20 y su capacidad para producir bajos niveles de lípidos saturados pueden estar relacionadas con la temperatura a la que crece el hongo en su hábitat natural, y también la actividad de sus enzimas. Sin embargo, futuras investigaciones profundizarán nuestra comprensión de la fisiología y el papel de este hongo lipolítico y otros parientes asociados con el bosque de *Nothofagus*

CAPÍTULO 3

Análisis de la actividad lipolítica extracelular de aislamientos patagónicos del género *Ophiostoma*

Introducción

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los acilglicérols y participan en reacciones de esterificación y transesterificación. En general, estas enzimas son triacilglicérol acil hidrolasas (EC 3.1.1.3), de la superfamilia de las α/β hidrolasas, uno de los grupos más grandes de enzimas que agrupa proteínas con diversas funcionalidades que comparten un plegamiento común (Holmquist 2000; Ollis et al. 1992) y catalizan los triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (Beisson et al. 2000, Joseph et al. 2008, Kanmani et al. 2015). Las numerosas aplicaciones industriales de las lipasas han estimulado el interés en el aislamiento de nuevas lipasas a partir de fuentes microbiológicas. En los últimos años se ha avanzado en su utilización en la producción de papel y cartón, dado que pueden modificar propiedades de las fibras y mejorar la resistencia y la suavidad de este producto. Un aspecto importante de las enzimas lipolíticas es el carácter fisicoquímico único de las reacciones que catalizan en las interfaces lípido-agua, que implican adsorción interfacial y posterior catálisis sensu estricto (Hasan et al. 2009) (Fig 23). Tradicionalmente, la producción de enzimas lipasas ha sido inducida mediante la adición de aceites, triglicéridos y otros lípidos al medio de cultivo, ya que estos compuestos actúan como inductores efectivos de la actividad enzimática (Rodríguez et al. 2006, Gupta et al. 2003, Sharma et al. 2001). En los últimos años, la utilización de residuos agroindustriales y agroforestales ha emergido como una alternativa prometedora para la producción de lipasas microbianas (Bharathi & Rajalakshmi 2019, Szymczak et al. 2021). Estos residuos, provenientes de la industria alimentaria, agrícola y forestal, son abundantes, económicos y contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano y la inducción de lipasas (Hasan et al. 2009). Algunos ejemplos de estos residuos incluyen el salvado de trigo (Garlapati & Banerjee 2010), cáscaras de arroz (Colen et al. 2006), residuos de semillas de ricino (Godoy et al. 2011) y salvado de cebada (Dominguez et al. 2003). Además, los residuos agroforestales como los restos de poda, el aserrín de pino y el bagazo de caña de azúcar también pueden ser sustratos de bajo costo para la producción de lipasas a escala industrial (Salihu et al. 2012,

Abdeshahian et al. 2020). Al emplear estos residuos, se pueden reducir significativamente los costos de producción y minimizar el impacto ambiental asociado con la eliminación de desechos. Además, estos sustratos no solo actúan como inductores eficientes debido a su contenido en lípidos y otros compuestos estimulantes, sino que también optimizan el medio de cultivo para una mayor producción enzimática (Salihu et al. 2012, Abdeshahian et al. 2020).

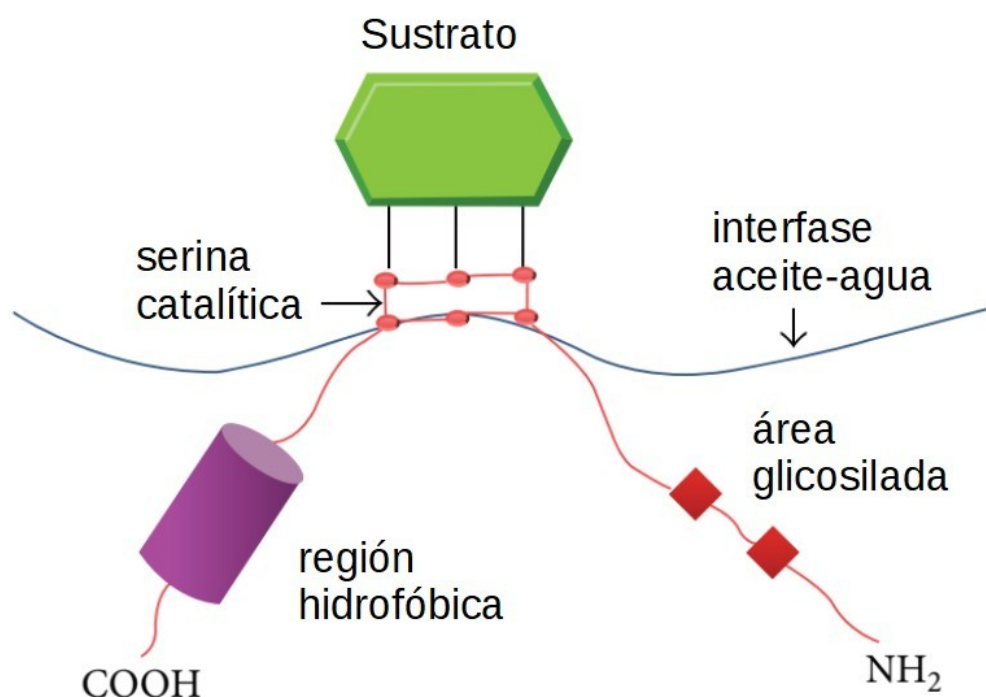


Fig 23. Esquema de la hidrólisis del triglicérido por la lipasa tiene lugar en la interfaz de la fase del sustrato insoluble y la fase acuosa

Dado que las enzimas fúngicas son de naturaleza extracelular y se pueden extraer fácilmente, son una fuente muy promisorio de lipasas. El género *Ophiostoma*, que incluye actualmente alrededor de 40 taxones mayormente asociados con el floema (con diversos grados de patogenicidad) de especies forestales y escarabajos de la madera son estudiados por causar manchas de albura en madera recién talada, más conocidas como mancha azul o mancha de savia, debido al crecimiento de hifas fúngicas pigmentadas (Seifert & Grylls 1990). Estos hongos manchadores no atacan la celulosa o la lignina de la pared celular, sino que degradan compuestos celulares libres y diferentes extractivos, la mayoría de ellos lípidos, que se metabolizan en las capas superficiales de la albura, constituyendo aproximadamente el 2% del peso seco total de la madera, incluyendo triglicéridos, ésteres de esteroides, ácidos resínicos, ácidos grasos libres y esteroides (Gao et al. 1995). Por este motivo, los hongos

manchadores se consideran potencialmente atractivos para la obtención de enzimas lipasas. Estas enzimas, que pueden ser producidas utilizando residuos forestales como sustrato de crecimiento, tienen la capacidad de degradar los lípidos presentes en la madera. Esto no solo ofrece una solución para mejorar la calidad de la madera, como por ejemplo en la industria papelera, donde los compuestos lipofílicos interfieren en el proceso y reducen la calidad del producto final (Gutiérrez et al. 2001), sino que también presenta una oportunidad para valorizar los residuos forestales, convirtiéndolos en productos de alto valor añadido (Kirk & Farrell, 1987, Couto & Sanromán, 2005).

Las enzimas lipolíticas del tipo esterases/lipasas se utilizan comercialmente para aumentar la estabilidad y resistencia del papel descomponiendo los ácidos y la resina formada durante la degradación de la lignocelulosa (Hasan et al. 2006, Vaquero et al. 2016). El género *Ophiostoma* ya cuenta con varios representantes en el mercado que producen lipasas y se comercializan principalmente para la industria papelera (Kumar et al. 2023). El objetivo de este capítulo es analizar la actividad lipasa en diferentes representantes del género *Ophiostoma*, aislados del bosque andino patagónico y evaluar esta actividad en extractos lipofílicos extraídos de la madera de *Nothofagus*.

Materiales y métodos

Aislamientos de hongos utilizados

Se utilizaron 14 aislamientos pertenecientes al género *Ophiostoma* obtenidos a partir de muestras de madera de ejemplares en pie de diferentes especies forestales de los bosques andino patagónicos, depositados en el cepario del CIEFAP. La Tabla 15 especifica los aislamientos utilizados.

Tabla 15. Aislamientos utilizados en el estudio, indicando el número de colección, el sustrato de donde fue aislado y el lugar de procedencia.

Especie	Número de colección	Sustrato de aislamiento	Lugar de procedencia
<i>O. grandicarpum</i>	CIEFAPcc 445	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Lago Rivadavia, Chubut, Argentina
<i>O. novae-zelandie</i>	CIEFAPcc 423	<i>Nothofagus obliqua</i>	Lago Laccar, Neuquén, Argentina
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 446	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Lago Rivadavia, Chubut, Argentina

<i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 455	<i>Nothofagus pumilio</i>	Lago Fagnano, Tierra del Fuego, Argentina
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 431	<i>Nothofagus pumilio</i>	Chubut, Argentina
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 449	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Lago Nahuel Huapi, Rio Negro, Argentina
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 463	<i>Schinus patagonicus</i>	Trevelin, Chubut, Argentina
<i>O. peregrinum</i>	CIEFAPcc 464	<i>Nothofagus pumilio</i>	Cordón Rivadavia, Chubut, Argentina
<i>O. peregrinum</i>	CIEFAPcc 469	<i>Pinus ponderosa</i>	Las Golondrinas, Chubut, Argentina
<i>O. piliferum</i>	CIEFAPcc 360	<i>Pinus ponderosa</i>	Aluminé, Neuquén, Argentina
<i>O. piliferum</i>	CIEFAPcc 475	<i>Pinus ponderosa</i>	Lago Lolog, Neuquén, Argentina
<i>O. quercus</i>	CIEFAPcc 440	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Río Azul, Río Negro, Argentina
<i>O. sp2</i>	CIEFAPcc 447	<i>Tepualia stipularis</i>	Puerto Blest, Río Negro, Argentina
<i>O. valdivianum</i>	CIEFAPcc 461	<i>Nothofagus pumilio</i>	Lago Fagnano, Tierra del Fuego, Argentina

Abreviaturas: CIEFAPcc, Centro de investigación y Extensión Forestal Andino patagónico
Colección de Cultivo .

Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular en medio sólido

Para evaluar el crecimiento se inocularon plugs de agar de 6 mm de diámetro de cada aislamiento en cajas de Petri que contenían 2 medios de cultivo agarizado: agar extracto de malta (MEA) y medio agarizado que contenía, en g/l, 5 peptona, 1 KH₂PO₄ y 0,1 MgSO₄, suplementado con una emulsión de aceite de oliva al 2% . El crecimiento fúngico se calculó midiendo el radio del micelio (cm) durante 7 días para cada tratamiento. La velocidad de crecimiento se estimó como el cociente entre el crecimiento fúngico y los días de incubación, y se expresa como cm/día. Para analizar la actividad de la lipasa se utilizaron Tween 20 y Tween 80 como única fuente de carbono, según Hankin & Anagnostakis (1975). La actividad lipolítica en estos medios se evidenció de dos maneras: un precipitado visible de la sal de calcio formada por el ácido graso de la reacción de hidrólisis, o una zona clara alrededor de la

colonia debido a la degradación completa de la sal de ácido graso. Se calculó la actividad enzimática como el cociente del radio de crecimiento del micelio y el halo de actividad como reportada es el capítulo 2 de esta tesis.

Evaluación de la actividad lipasa extracelular en medio líquido

La evaluación de la actividad lipasa extracelular de los hongos se realizó utilizando como fuente de las enzimas sobrenadantes de cultivos líquidos. Éstos se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 250 ml que contenían 50 ml de medio basal (compuesto por (g/l): 2 glucosa, 5 peptona, 1 CaCl₂, 0,1 MgSO₄ y 0,5 NaCl), suplementado con aserrín y chips de *Nothofagus* sp. al 2% (p/v) y 1% de goma arábiga, que fueron inoculados con 1 plug de agar de 6 mm colonizado por micelio fúngico, y se incubaron por 7 días en agitación periódica y en oscuridad a 24° C. Los sobrenadantes se recuperaron mediante filtración utilizando papel Whatman® N°2 y luego por filtro de nitrocelulosa (tamaño de poro: 0.22 µm) asistido con una bomba de vacío en el flujo laminar a fin de obtener fracciones líquidas estériles libres de la biomasa fúngica.

La actividad lipolítica extracelular se determinó espectrofotométricamente utilizando dos tipos de sustratos: palmitato de p-nitrofenilo (pNPP; Sigma-Aldrich) y el éster de ácido 1,2-O-dilauril-rac-glicerol-3-glutárico-(6'-metilresorufina) (DGGR; Wiener-Lab, Argentina) (Panteghini et al. 2001). Para el caso del pNPP, se preparó una solución madre de 3 mM en dimetilsulfóxido y se añadió un volumen igual de tampón fosfato de potasio (pH = 6,8). Se añadió un volumen de 50 µl de solución de pNPP a 100 µL de extracto y se incubó durante 2 horas a 24 °C. La reacción se detuvo añadiendo 25 µl de carbonato de sodio 0,1 M y se midió la liberación de p-nitrofenol (pNP) a 410 nm en microplaca de 96 pocillos, en el lector de microplacas Multiskan™ SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera un mmol de pNP en un minuto en las condiciones del ensayo (Kotogan et al. 2014).

Para la reacción utilizando el sustrato DGGR se llevó a cabo el método reportado por Panteghini et al. (2001). Este consistió en agregar 100 µl de sobrenadante, 50 µl de buffer Tris-HCl 400 mM, pH 7,5, que contenía CaCl₂ 10 mM, y 30 µl de la solución del sustrato Lipasa AA líquida (Wiener-Lab). El coeficiente de absorción molar de la metilresorufina (producto de la reacción) a 580 nm fue de 62.300 l/mol/cm. La reacción se midió a 24 °C, en microplaca de 96 pocillos, en lector de microplacas Multiskan™ SkyHigh (Thermo Fisher

Scientific, EE. UU.). La actividad de la lipasa extracelular en ambos métodos se expresó como unidades por ml de sobrenadante (U/ml). Una unidad de lipasa (U) se definió como la cantidad de enzima que libera un μmol de sustrato por minuto en condiciones específicas.

La actividad enzimática se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Actividad} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{Ab * vol . reac}{\epsilon * b * vol . enz * tiempo de reac}$$

donde la Ab es la absorbancia medida, vol reac es el volumen total de reacción, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($1.2475 \times 10^4 \text{ M/cm.l}$ en pNP y 63500 M/cm.ml en DGGR), b es el paso óptico, vol enz es el volumen de la enzima y el tiempo de reacción el tiempo total de reacción medido.

Evaluación de la estabilidad térmica de la actividad lipolítica extracelular de cultivos seleccionados

Sobre la base de los resultados obtenidos en los puntos previos, se evaluó la termoestabilidad de la actividad lipasa de los sobrenadantes de cultivos de 7 días de los aislamientos de *O. nothofagi* CIEFAPcc 446, *O. patagonicum* CIEFAPcc 463 y *O. piliferum* CIEFAPcc 475, preincubándolos por diferentes periodos de tiempo (1, 12 y 24 horas) a diferentes temperaturas (-10, 4, 24 y 60 °C) , y valorando su actividad residual como es indicado en el apartado anterior.

Obtención de extraíbles liposolubles de la madera de *Nothofagus* y análisis de sus lípidos totales

Utilizando como fuente el aserrín de la madera empleado en la formulación del medio líquido, se realizó la extracción de compuestos liposolubles con cloroformo y metanol siguiendo la metodología de Folch (Folch et al. 1957). Para ello, se utilizó una proporción de 30 ml de una solución cloroformo:metanol (2:1) con 2 gramos de aserrín. Los perfiles lipídicos de estos extraíbles se determinaron mediante cromatografía en capa fina (TLC): se aplicó a una placa de gel de sílice poliéster Polygram SIL G 40 $\times$ 80 mm (Macherey–Nagel, Alemania) usando una mezcla de solventes (70 hexano, 30 éter etílico, 1 ácido acético) como fase móvil. El perfil lipídico se observó sumergiendo la placa en una solución de ácido sulfúrico en etanol al 5% y luego exponiendo la placa a 180 °C. Para la identificación de las

bandas, los estándares utilizados fueron (Nu-Chek-Prep Inc. EE. UU.) tripalmitato de glicerilo (TG), glicerilo dipalmitato (DG) y un ácido graso (AG). La cuantificación relativa de las bandas correspondientes a los lípidos individuales se realizó mediante densitometría, utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.).

Evaluación de la actividad lipasa extracelular de aislamientos seleccionados a baja temperatura estimando la producción de ácidos grasos libres en mezclas de reacción usando un extraíble lipofílico de madera de *Nothofagus* como fuente de sustratos enzimáticos

A fin de indagar en el potencial de las enzimas lipolíticas de algunos de los hongos bajo estudio y su relación con la temperatura promedio del hábitat de procedencia y los resultados de termoestabilidad obtenidos, se realizó la incubación a 4 °C de 30 mg (masa seca) del extraíble obtenido del aserrín/chip de *Nothofagus* utilizado en este trabajo junto con 5 ml del sobrenadante de los cultivos líquidos de 7 días de los aislamientos que presentaron mayor actividad en medio sólido como en medio líquido. Estos aislamientos fueron *O. grandicarpum* CIEFAPcc 445, *O. nothofagi* CIEFAPcc 446, *O. patagonicum* CIEFAPcc 463 y *O. piliferum* CIEFAPcc 475. Transcurridas 24 horas de incubación, las mezclas se procesaron a fin de obtener extractos según Aquino et al. (2023) que se utilizaron para estimar la composición en ácidos grasos libres y sus porcentajes relativos utilizando cromatografía gaseosa. En paralelo, se realizaron como control, incubaciones separadas del extraíble y de cada sobrenadante. Se analizó la diferencia entre el porcentaje de cada ácido graso libre detectado en el extracto de la madera de *Nothofagus* de partida (control) y aquellos correspondientes al mismo ácido en la mezcla conteniendo también algún sobrenadante derivado de los cultivos fúngicos, así como también al control conteniendo solo el sobrenadante.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se determinaron los valores medios y el error estándar. Los datos sobre los niveles de la actividad lipasa se sometieron a un Análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional. Las diferencias detectadas por ANOVA se analizaron mediante la prueba de Tukey. Se examinó la normalidad de los datos (prueba de ShapiroWilks modificada, $\alpha = 0.05$) y la homocedasticidad (prueba de Levene, $\alpha = 0.05$). Se

realizaron análisis no paramétricos cuando los conjuntos de datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo et al. 2010). Las figuras se crearon con GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Resultados

Evaluación del crecimiento fúngico y actividad lipasa extracelular

Todos los aislamientos mostraron actividad lipasa extracelular, y la relación entre la hidrólisis del Tween y el crecimiento micelial mostró diferencias según el tipo de sustrato utilizado, siendo mayor en presencia de Tween 20 y del aislamiento. Entre estos, los niveles más altos se detectaron para *O. piliferum* CIEFAPcc 475. El aislamiento CIEFAPcc 360 de *O. piliferum* también mostró altos valores de actividad en placa. Además, destaca la relación de halos de hidrólisis al crecimiento en los cultivos de los aislamientos de *O. nothofagi* CIEFAPcc 455 y CIEFAPcc 446 en el medio con Tween 20. Sin embargo, esta especie tiene un crecimiento más lento en comparación con los otros aislamientos (0.12 cm/día para CIEFAPcc 446 versus 0.36 cm/día para CIEFAPcc 475). En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de la velocidad de crecimiento y actividad enzimática de cada uno de los aislamientos. Analizando los cultivos líquidos, el mayor valor de actividad lipolítica utilizando los 2 sustratos se obtuvo con el aislamiento de *O. piliferum* CIEFAPcc 475 (28.66 U/ml y 0.079 U/ml). Las metodologías utilizadas muestran diferencias en cuanto al rango de actividad medido, con valores mucho más bajos para DGGR que utilizando pNPP como sustrato. El análisis estadístico muestra que no hubo diferencias significativas entre los aislamientos en la actividad medida con DGGR. En la Tabla 17 se presentan los datos de actividad enzimática en medio líquido con las dos metodologías utilizadas.

Tabla 16. Crecimiento y actividad lipolítica extracelular en medios sólidos

Especie	Cepa	Velocidad de crecimiento (cm/día)	Actividad lipolítica (relación actividad/radio de crecimiento)	
		APG	Tween 20	Tween 80
<i>O. grandicarpum</i>	CIEFAPcc 445	0.37 ± 0.04 def	0.26 ± 0.02 ^{cd}	0.25 ± 0.02 ^{de}

<i>O. novae-zelandie</i>	CIEFAPcc 423	0.33 ± 0.02 _{cdef}	0.17 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 _{bcd}
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 446	0.14 ± 0.05 ^a	0.32 ± 0.09 _{cde}	1.50 ± 0.04 ^a
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 455	0.12 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.02 _{cde}	0.21 ± 0.01 _{cde}
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 431	0.30 ± 0.01 _{bcd}	0.27 ± 0.03_{cde}	0.31 ± 0.01^e
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 449	0.24 ± 0.04 _{abc}	0.25 ± 0.02 _{bcd}	1.25 ± 0.38 _{abcd}
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 463	0.26 ± 0.04 _{abcd}	0.35 ± 0.02^{de}	2.04 ± 0.13^e
<i>O. peregrinum</i>	CIEFAPcc 464	0.28 ± 0.05 _{bcd}	0.24 ± 0.04 _{abc}	1.63 ± 0.25 _{cde}
<i>O. peregrinum</i>	CIEFAPcc 469	0.44 ± 0.06^{ef}	0.22 ± 0.02 _{abc}	1.23 ± 0.03 _{abc}
<i>O. piliferum</i>	CIEFAPcc 360	0.45 ± 0.01^f	0.28 ± 0.05 _{cde}	0.17 ± 0.01 _{ab}
<i>O. piliferum</i>	CIEFAPcc 475	0.36 ± 0.01^{def}	0.45 ± 0.03^e	2.35 ± 0.42^e
<i>O. quercus</i>	CIEFAPcc 440	0.31 ± 0.04 _{bcd}	0.17 ± 0.01 _{ab}	0.16 ± 0.01 _{ab}
<i>O. sp2</i>	CIEFAPcc 447	0.29 ± 0.01 _{bcd}	0.25 ± 0.04 _{abcd}	1.25 ± 0.04 _{abcd}
<i>O. valdivianum</i>	CIEFAPcc 461	0.21 ± 0.02 _{ab}	0.17 ± 0.01 ^a	1.38 ± 0.09 _{abcd}

*Valores de la media de las réplicas ± la desviación estándar. Letras diferentes hacen referencia a diferencias significativas (pvalor < 0.05) entre los aislamientos para cada parámetro evaluado. La actividad enzimática se calculó como el cociente del halo hidrolítico (en cm) y el radio de crecimiento (en cm).

Tabla 17. Actividad lipolítica extracelular de los sobrenadantes de los aislamientos utilizados

Especie	N° de cepario	sustrato enzimático	
		pNPP	DGGR
<i>O. grandicarpum</i>	CIEFAPcc 445	27.75 ± 6.95^c	0.052 ± 0.014
<i>O. novae-zelandie</i>	CIEFAPcc 423	0.46 ± 0.06 ^a	0.011 ± 0.015
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 446	11.67 ± 6.72 _{abc}	0.019 ± 0.000
<i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 455	8.13 ± 3.36 _{abc}	n/d

<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 431	8.79 ± 0.41^{abc}	0.034 ± 0.003
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 449	4.88 ± 0.18^{ab}	n/d
<i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 463	10.58 ± 3.65^{abc}	0.035 ± 0.008
<i>O. peregrinum</i>	CIEFAPcc 464	n/d	n/d
<i>O. peregrinum</i>	CIEFAPcc 469	n/d	n/d
<i>O. piliferum</i>	CIEFAPcc 360	15.58 ± 3.65^{bc}	0.013 ± 0.009
<i>O. piliferum</i>	CIEFAPcc 475	28.96 ± 0.77^c	0.079 ± 0.012
<i>O. quercus</i>	CIEFAPcc 440	3.17 ± 0.82^a	0.038 ± 0.018
<i>O. sp2</i>	CIEFAPcc 447	n/d	n/d
<i>O. valdivianum</i>	CIEFAPcc 461	5.13 ± 0.65^{ab}	0.010 ± 0.005

*Valores de la media de las réplicas $\pm$ la desviación estándar, con los sustratos de p-nitrofenil palmitato y DGGR. La actividad es expresada en U/ml. n/d se refiere a que no se ha detectado actividad.

Análisis de la estabilidad térmica de la actividad lipolítica extracelular de cultivos seleccionados

Sobre la base de los resultados obtenidos a partir de los cultivos agarizados y líquidos analizados en el apartado anterior y no existiendo antecedentes bibliográficos sobre la actividad lipasa de las especies *O. nothofagi* y *O. patagonicum*, se seleccionaron los aislamientos *O. nothofagi* CIEFAPcc 446, *O. patagonicum* CIEFAPcc 463 y *O. piliferum*. CIEFAPcc 475 para analizar la termoestabilidad de la actividad lipasa de sus sobrenadantes correspondientes a cultivos de 7 días de incubación. Los sobrenadantes analizados de los cultivos de la cepa CIEFAPcc 446 presentaron variaciones en los niveles de su actividad lipasa extracelular a lo largo del tiempo de exposición a diferentes temperaturas, con incremento a las 12 horas seguido de una estabilización o ligera disminución a las 24 horas. La actividad enzimática se mantuvo relativamente constante a -10°C y 4°C , mientras que mostró variaciones mayores a 24°C y 60°C , indicando menor estabilidad en estas últimas condiciones. La actividad enzimática se mantuvo prácticamente constante a lo largo del tiempo para todas las condiciones de temperatura. La actividad lipasa extracelular de la CIEFAPcc 463 mostró un incremento significativo después de pasadas 12 horas seguido de una estabilización o ligera disminución a las 24 horas. La actividad se incrementa

notablemente a 4°C, lo que sugiere que esta temperatura puede ser óptima para la estabilidad de este aislamiento en particular. A 24°C y 60°C, la actividad enzimática disminuye, indicando menor estabilidad. La actividad enzimática se mantiene constante o presenta pequeñas variaciones a lo largo del tiempo. CIEFAPcc 475 incrementa la actividad a las 12 horas y luego se estabiliza o disminuye ligeramente a las 24 horas. Al igual que CIEFAPcc 463, la estabilidad parece ser mejor a 4°C, mientras que a 24°C y 60°C se observa una disminución en la actividad enzimática, sugiriendo una menor estabilidad. La actividad enzimática se mantiene relativamente constante con pequeñas variaciones a lo largo del tiempo. Los valores de actividad de las 3 cepas para las tres temperaturas y los tres tiempos se presentan en la figura 24.

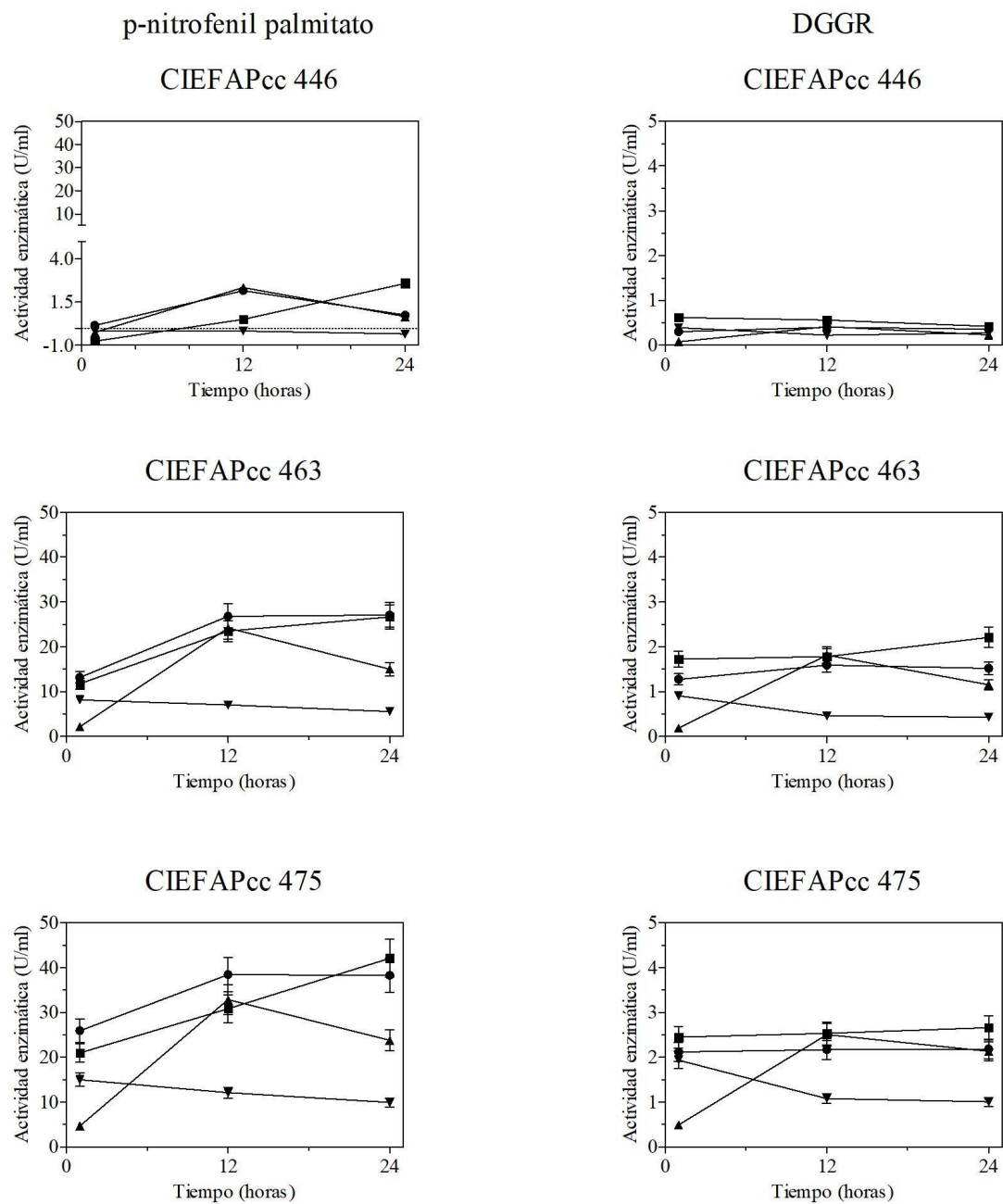


Fig 24. Evolución de los niveles de actividad lipasa extracelular de cultivos de hongos seleccionados en función del tiempo de incubación bajo diferentes temperaturas. Para todos los casos, los símbolos representan las condiciones de temperatura: ● -10° C, ■ 4° C, ▲ 24° C, ▼ 60° C.

Análisis de los lípidos totales de un extraíble liposoluble de la madera de *Nothofagus* y de los sobrenadantes de los aislamientos seleccionados

El extraíble liposoluble del aserrín de la madera de *Nothofagus* fue analizado cualitativamente por cromatografía de capa fina. En la Fig 25 se puede observar una gran cantidad de ácidos grasos libres en el extracto de madera y en los extractos de sobrenadantes de los aislamientos de *O. piliferum* CIEFAPcc 475 y *O. patagonicum* CIEFAP 463. También se puede observar una disminución en la intensidad de las bandas de Triglicéridos (TG) comparando los sobrenadantes con su par sobrenadante + extracto de madera: este patrón se observó además en los ácidos grasos (AG) libres para cada par.

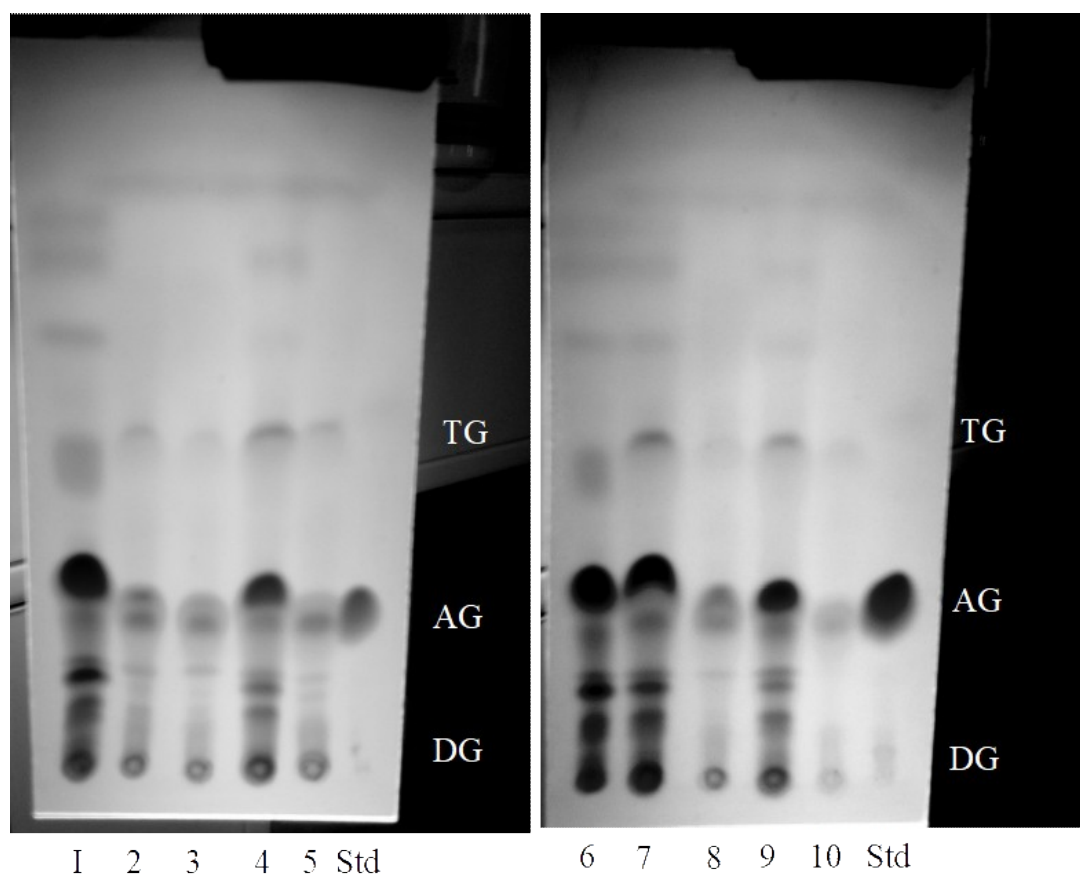


Fig 25. TLC de las muestras utilizadas 1) extracto de *Nothofagus*; 2) Extracto de *Nothofagus* + Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 446; 3) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 446; 4) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 445; 5) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 445; 6) Extracto de *Nothofagus*; 7) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 475, 8) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 475; 9) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 463, 10) Extracto de sobrenadante CIEFAPcc 463.

Evaluación de la actividad lipasa extracelular de aislamientos seleccionados a baja temperatura, estimando la producción de ácidos grasos libres en mezclas de reacción usando un extraíble lipofílico de madera de *Nothofagus* como fuentes de sustratos enzimáticos

Los cromatogramas del análisis del GC-MS del extracto de *Nothofagus* y de los aislamientos se presentan en la Tabla 18. En el extracto de madera se obtuvo que los ácidos grasos mayoritarios son el ácido linoléico (22.64 %), el ácido palmítico (19.55 %), el ácido α linolénico (15.23 %) y el ácido behénico (10.43 %); el resto de los ácidos grasos no supera el 10 %. Para cada aislamiento se presentan los ácidos grasos del sobrenadante del cultivo y el sobrenadante con el extracto de *Nothofagus*. Los ácidos grasos que componían cada sobrenadante fueron variables. Para el sobrenadante de *O. grandicarpum* CIEFAPcc 445 los ácidos grasos mayoritarios fueron el ácido láurico (39.71%), ácido mirístico (21.21 %), ácido palmítico (14.65 %), ácido oléico (10.88%), ácido cáprico (3.40%), ácido esteárico (3.19%), ácido caprílico (1.37%), y ácido linoléico (1.14%). Para el sobrenadante de *O. nothofagi* CIEFAPcc 446 el ácido láurico (43.05 %), ácido mirístico (19.85 %), ácido palmítico (12.54 %), ácido oléico (12.04 %), ácido esteárico (4.74%) y ácido cáprico (3.10%). Para el sobrenadante de *O. patagonicum* CIEFAPcc 463 el ácido oléico (30.90%), ácido láurico (27.41%), ácido palmítico (13.88 %), ácido mirístico (8.46 %), el ácido esteárico (8.29%), ácido cáprico (2.83%), Octadec-11-enoico (1.74%), ácido linoléico (1.57%) y ácido palmitoleico (1.55%). Para el sobrenadante de *O. piliferum* CIEFAPcc 475 el ácido láurico (37.88%), ácido mirístico (23.64 %), ácido palmítico (17.07 %), ácido oléico (7.56%), ácido esteárico (5.34%) y ácido cáprico (4.20%). El resto de los ácidos grasos que se detectaron no superaron el 1%. Estos valores indican la composición primaria de cada uno de los sobrenadantes. Para evaluar la degradación de los lípidos por acción de cada uno de los sobrenadantes se consideró la diferencia entre los ácidos grasos del extracto de la madera de *Nothofagus* y el extracto tratado con el sobrenadante, considerando que cada sobrenadante tenía en su composición inicial ácidos grasos. En la Tabla 19 se presentan los ácidos grasos que aumentaron luego de la incorporación del sobrenadante al extracto de la madera.

Tabla 18. Ácidos grasos totales obtenidos por cromatografía debido a la acción de los sobrenadantes de los aislamientos utilizados sobre el extracto de madera de *Nothofagus* y ácidos grasos propios de la madera de *Nothofagus*

T. de retención		Nombre del compuesto	Extracto de <i>Nothofagus</i> %	CIEFAPcc 445 <i>O. grandicarpum</i> %	CIEFAPcc 446 <i>O. nothofagi</i> %	CIEFAPcc 463 <i>O. patagonicum</i> %	CIEFAPcc 475 <i>O. piliferum</i> %
4.1	C8:0	Octanoico (Caprílico)	0.023	0.190	0.701	-0.244	0.251
4.4	C9:0	Nonanoico	0.000	0.011	0.000	0.014	0.003
4.8	C10:0	Decanoico (Cáprico)	0.040	-0.654	0.416	-1.765	-0.216
5.3	C11:0	Undecanoico	0.000	-0.002	-0.058	0.017	-0.003
5.9	C12:0	Dodecanoico (Laurico)	0.432	-16.253	-0.596	-14.527	-5.284
6.6	C13:0	Tridecanoico	0.000	-0.008	0.002	-0.049	0.005
7.5	C14:0	Tetradecanoico (Mirístico)	1.108	-5.895	0.334	-3.558	-4.222
8.0	x-metil C14:0	x-metil tetradecanoico	0.000	-0.039	-0.053	-0.107	-0.008
8.2	x-metil C14:0	x-metil tetradecanoico	0.000	-0.001	-0.094	-0.191	-0.002
8.6	C15:0	Pentadecanoico	0.341	0.061	0.024	-0.023	0.020
8.9	x-metil C15:0	x-metil pentadecanoico	0.795	0.332	0.000	0.641	0.148
9.3	x-metil C15:0	x-metil pentadecanoico	0.000	0.000	-0.038	-0.123	-0.002
10.0	C16:0	Hexadecanoico (Palmitico)	19.548	1.707	1.136	3.262	-0.510
10.3	7-C16:1	Hexadec-7-enoico	0.388	0.076	0.008	-0.161	0.095
10.4	9-C16:1	Hexadec-9-enoico (Palmitoleico)	0.232	-0.172	-0.137	-1.152	-0.215

10.6	AG no identif	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023
10.8	x- metil C16:0	x-metil hexadecanoico	0.000	0.000	0.000	0.074	0.019
11.0	x- metil C16:0	x-metil hexadecanoico	0.000	-0.066	-0.089	-0.310	0.000
11.5	C17:0	Heptadecanoico (Margarico)	0.643	0.184	0.008	0.052	0.101
12.0	AG no identif	-	0.000	-0.040	-0.159	-0.356	0.000
12.1	AG no identif	-	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.044
13.4	C18:0	Octadecanoico (Estearico)	2.840	-0.557	-0.341	-4.824	-0.920
13.8	9- C18:1	Octadec-9-enoico (Oleico)	4.973	-3.583	-3.166	-21.695	-1.567
13.9	11- C18:1	Octadec-11-enoico	0.688	0.088	-0.145	-0.898	-0.009
14.0	AG no identif	-	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.003
14.2	AG no identif	-	0.000	0.075	0.000	0.000	0.037
14.7	9,12- C18:2	Octadec-9,12-dienoico (Linoleico)	22.645	7.721	0.669	15.658	4.128
15.3	C19:0	Nonadecanoico	0.000	0.069	0.000	0.110	0.031
16.0	9,12,1 5- C18:3	Octadec-9,12,15- trienoico (alfa- Linolenico)	15.233	4.682	0.398	10.656	2.602
16.5	x,y- C18:2	Octadec-x,y-dienoico	0.000	0.082	-0.106	0.000	-0.013
16.7	x,y- C18:2	Octadec-x,y-dienoico	0.000	0.062	-0.084	0.000	-0.020
17.4	C20:0	Eicosanoico (Araquidico)	4.517	1.704	0.160	3.388	0.808

19.6	C21:0	Eneicosanoico	0.686	0.297	0.000	0.572	0.150
21.8	C22:0	Docosanoico (Behénico)	10.435	4.126	0.428	7.877	1.954
24.0	C23:0	Tricosanoico	1.200	0.554	0.000	0.806	0.261
26.2	C24:0	Tetracosanoico (Lignocérico)	8.256	3.855	0.784	6.858	1.513
28.4	C25:0	Pentacosanoico	0.627	0.000	0.000	0.000	0.000
30.7	C26:0	Hexacosanoico (Cerótico)	3.180	1.393	0.000	0.000	0.681
37.0	C28:0	Octacosanoico(Montá nico)	1.171	0.000	0.000	0.000	0.210

Los datos representan la diferencia del área entre los ácidos grasos de la madera de *Nothofagus*, los ácidos grasos iniciales de cada uno de los sobrenadantes y los ácidos grasos obtenidos luego de la incorporación de los sobrenadantes al extracto de *Nothofagus*

Tabla 19. Ácidos grasos que aumentaron luego de la incorporación del sobrenadante fúngico al extracto de *Nothofagus*, calculados como la diferencia entre el porcentaje de cada ácido graso del sobrenadante de cada aislamiento con extracto de *Nothofagus* y el extracto de *Nothofagus* inicial.

Ácido graso	CIEFAPcc 445 <i>O. grandicarpum</i>	CIEFAPcc 446 <i>O. nothofagi</i>	CIEFAPcc 463 <i>O. patagonicum</i>	CIEFAPcc 475 <i>O. piliferum</i>
ácido octánico (caprílico)	0.1670	0.6784	-	0.2283
ácido nonánico	0.0108	-	0.0137	0.0031
Decanoico (Cáprico)	-	0.3758	-	-
Undecanoico	-	-	0.0170	-
Tridecanoico	-	0.0016	-	0.0052
-	-	-	-	0.0227
x-metil hexadecanoico	-	-	0.0744	0.0193
-	0.0754	-	-	0.0373
Nonadecanoico	0.0689	-	0.1101	0.0306
Octadec-x,y- dienoico	0.0819	-	-	-
Octadec-x,y- dienoico	0.0617	-	-	-

Discusión

Análisis de la actividad enzimática

Todos los aislamientos mostraron actividad lipolítica extracelular, lo cual es coherente con estudios previos dentro del género (Hasan et al. 2006). Se obtuvieron diferencias entre los medios que contenían Tween 20 y Tween 80, mostrando que con Tween 20 habría más actividad lipolítica. La utilización de Tween ya está citada en la bibliografía como sustrato para la detección de la actividad enzimática (Hankins & Anagnostakis, 1975, Plou et al. 1998, Nwuche et al. 2011, Geoffry & Achur 2018) y en *Ophiostoma* Herrera et al. (2015) utiliza Tween 80 como indicador de la actividad lipolítica en cepas de *O. piliferum*. Usar ambos compuestos permite cubrir un rango más amplio de sustratos debido a que la diferencia en la longitud y la insaturación de las cadenas de sus ácidos grasos puede estimar la especificidad enzimática.

En el screening inicial observamos que la cepa CIEFAPcc 475 de *Ophiostoma piliferum* fue la que mayor actividad mostró tanto en medio líquido como en medio sólido. Esta especie ya ha sido reportada por su alta producción de lipasas, y actualmente se utiliza comercialmente en la industria papelera para la reducción del pitch (George et al. 1999, Gutierrez et al. 2010). *O. patagonicum* (CIEFAPcc 463) (especie cercana a *O. piceae*) (de Errasti. 2016) y *O. grandicarpum* (CIEFAPcc 463) mostraron también altos resultados de actividad. No hay estudios previos de actividad de estas especies por lo que este trabajo sería el primero, y los resultados obtenidos muestran que podrían tener un potencial para futuras aplicaciones industriales a investigar. *Ophiostoma nothofagi* (CIEFAPcc 446), especie endémica de la región patagónica, tuvo un crecimiento más lento en comparación con otros aislamientos pero mostró una notable actividad en presencia de Tween 20. Esto sugiere que, aunque la capacidad de producción enzimática es alta, el crecimiento micelial puede ser un factor limitante, lo cual es importante considerar en aplicaciones industriales donde el rendimiento global es crítico (Mahadik et al. 2002).

La medición y detección de la actividad enzimática en medios ricos en lípidos es complicada debido a que las enzimas, al ser solubles en agua, deben degradar sustratos que no se mezclan con el agua. La actividad enzimática, por lo tanto, ocurre en la interfaz entre las fases acuosa y lipídica, lo que añade un nivel de complejidad al proceso (Gupta et al. 2003). Los métodos de evaluación utilizados, DGGR y pNPP, mostraron diferencias significativas en los valores de actividad enzimática medidos. Los valores fueron mucho más

bajos con DGGR en comparación con pNPP, lo cual podría deberse a las diferencias en la sensibilidad y especificidad de estos sustratos para la detección de actividad lipásica (Gupta et al. 2003). Treichel et al. (2010) demostraron que la elección del sustrato puede influir considerablemente en los resultados de la actividad enzimática reportada. Además, el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas en la actividad medida con DGGR entre los diferentes aislamientos, lo que podría sugerir que los aislamientos tienen una especificidad natural más alta hacia pNPP que hacia DGGR, la estructura química del pNPP podría ser más favorable para la catálisis por la lipasa específica. Dado que la actividad lipolítica puede ser muy débil en circunstancias en las que las enzimas son difusas, es posible que no se note la actividad a menos que se apliquen métodos de detección extremadamente sensibles. En cuanto a los modelos cinéticos que describen la acción de estas enzimas, debemos recordar que, al actuar sobre sustratos hidrófobos, en soluciones acuosas se suele encontrar un equilibrio entre monómeros, agregados, micelas y emulsiones. Las lipasas actúan en la interfaz lípido/agua, lo que hace que su cinética no se ajuste a las ecuaciones de Michaelis-Menten (Jaeger y Reetz, 1998). Los tensioactivos, como glicéridos parciales y ácidos grasos libres formados durante la reacción, se acumulan en la interfaz e impiden el acceso de la lipasa al sustrato (Markweg-Hanke et al. 1995).

La utilización de desechos agroindustriales proporciona sustratos alternativos y puede ayudar a resolver los problemas de que de otro modo podrían ser causados por su eliminación. La elección del sustrato depende de varios factores, principalmente relacionados con el coste y la disponibilidad. En este trabajo, utilizamos la madera de *Nothofagus* como inductor, representativa de los bosque andino patagónico, de donde fueron aisladas la mayoría de las cepas. Esta madera se emplea comúnmente en la construcción y otros fines, generando residuos como aserrín y viruta que generalmente no reciben ningún tratamiento. Estos residuos suelen ser simplemente dispuestos en el suelo sin ningún tipo de manejo posterior (Contardi y de Errasti, 2012). Alkan et al. (2007) estudiaron el efecto de varios residuos agroindustriales (salvado de trigo, cáscara de arroz, cáscara de lenteja, desechos de plátano, desechos de sandía y desechos de melón) en la producción de lipasa. Kempka et al. (2008) produjeron lipasa a partir de *P. verrucosum* utilizando harina de soja, melaza de caña de azúcar, licor de maceración de maíz, levadura hidrolizada, extracto de levadura, cloruro de sodio, aceite de soja, aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de oliva y peptona. Sun & Xu (2008) informaron que un sustrato combinado de harina de trigo con salvado de trigo favoreció una buena producción de biomasa y enzimas por parte de *R. chinensis*.

La termoestabilidad de las lipasas se ha considerado como la característica más importante para su uso en la industria (Herbert, 1992). La estabilidad enzimática observada en los diferentes aislamientos sugiere que, dependiendo del sustrato, algunos aislamientos son más eficientes y estables en sus actividades catalíticas. Las diferencias observadas frente a los dos sustratos pueden deberse a varios factores, como diferencias intrínsecas en la secuencia de aminoácidos de las enzimas, variaciones en la expresión génica o en la estabilidad estructural de las proteínas. Además, el tipo de sustrato puede influir en la afinidad enzimática y en la velocidad de la reacción catalítica. Por ejemplo, las cepas CIEFAPcc 475 y CIEFAPcc 463 muestran una mejor estabilidad y actividad frente a p-nitrofenil palmitato. Los resultados indican que la estabilidad enzimática es mayor a temperaturas bajas (-10°C y 4°C) para la mayoría de los aislamientos y sustratos. A temperaturas más altas (24°C y 60°C), la actividad enzimática tiende a disminuir, reflejando una menor estabilidad. Otros autores reportan la estabilidad térmica de las enzimas purificadas permanecen activas en el rango de 30 a 50 °C durante algunas horas, en aislamientos obtenidos en zonas más tropicales (Kontkanen et al. 2006, Vaquero et al. 2015). Las lipasas de hongos mesófilos son estables en soluciones a temperatura ambiente, asumiendo que no hay actividad proteolítica. La mayoría pierde su actividad por arriba de los 40 °C pero algunas, como las secretadas por los hongos termófilos, son más resistentes a la inactivación, como por ejemplo *Humicola lanuginosa* que secreta una lipasa estable a 60 °C (Liu et al. 1973). Nuestros aislamientos se obtuvieron en el bosque andino patagónico, pueden crecer a bajas temperaturas (entre 3-8°C), evidenciando manchas graves en la madera almacenada a bajas temperaturas. Podemos decir que estos organismos psicrófilos podrían producir enzimas lipasas activas en frío. Se han realizado pocos estudios de lipasas activas en frío a partir de hongos tolerantes a las bajas temperaturas, algunos ejemplos incluyen *Candida lipolytica*, *Candida antarctica*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti* y *Aspergillus nidulans* aislados de muestras de alimentos congelados y del suelo de la antártida (Alford & Pierce, 1961, Mayordomo et al. 2000, Zhang et al. 2003). La producción de la enzima adaptada al frío es la estrategia más utilizada por los organismos psicrófilos como un supuesto mecanismo de adaptación al frío, aumentando la flexibilidad de sus estructuras para compensar el efecto de congelación en estos hábitats (Kavitha 2016, Collins & Feller 2023).

Determinación de los extractivos de la madera

Los extractos son componentes no estructurales importantes de la madera que exhiben una alta diversidad química, por ejemplo, compuestos hidrófilos y lipófilos. La fracción lipofílica se compone de ácidos grasos libres, ácidos resínicos, esteroides libres y esterificados, ceras, terpenos y glicéridos (Hillis, 1962; Fengel & Wegener 1984). La composición y abundancia de la fracción extraíble varía entre las diferentes especies de plantas. Los esteroides libres y esterificados constituyen la parte de la fracción lipofílica de la madera de algunas especies de frondosas. En cuanto a la composición del extracto de *Nothofagus*, en este trabajo obtuvimos ácido palmítico y ácido linolénico como los ácidos grasos mayoritarios. En otras especies forestales como en *Eucalyptus globulus* (Gutierrez et al. 1999), *Pinus sylvestris* (Saranpaa & Nyberg 1987, Fischer & Holl 1992), *Abies alba* (Salem et al. 2015, Wajs-Bonikowska et al. 2016), *Picea abies* (Salem et al. 2015, Wajs-Bonikowska et al. 2016), *Larix decidua* (Salem et al. 2015), *Cedrus libani* (Hafizoğlu & Holmbom, 1987) y *Populus tremuloides* (Sithole et al. 1992), los ácidos grasos dominantes son el ácido linoléico (18:1) () y el ácido oleico (18:2) (). Estos valores también reporta Rugolo (2018) en sustrato de *Nothofagus*. Gao (1996) demostró que el aumento en la cantidad de ácidos grasos libres estuvo estrechamente relacionado con la disminución de la cantidad de triglicéridos luego de la inoculación con *Ophiostoma*. Martinez et al. (2000) evidenciaron la actividad de cepas de *Ophiostoma* como reductores de los extractos de la madera. Las cepas albinas de *O. piliferum* (Cartapip™) (Farrel et al. 1993) pueden reducir el contenido de extractivos de la madera (triglicéridos, ácidos grasos y ácidos resínicos). Gutierrez et al. (1999) muestran una reducción de triglicéridos del 49% y 40% para dos cepas de *O. piliferum*. Abraham et al. (1998) también señalan una reducción de triglicéridos y un aumento de ácidos grasos por acción de *O. piliferum*. En nuestro trabajo no vemos este aumento de ácidos grasos libres tan marcado. Obtuvimos el aumento de solo algunos ácidos grasos, siendo la cepa CIEFAPcc 475 de *O. piliferum* la que más variedades de ácidos grasos aumentó y la cepa CIEFAPcc de *O. nothofagi* la de menor variedad. Esto podría indicar que esos ácidos grasos son productos de la degradación enzimática de los lípidos presentes en la madera de *Nothofagus* (Gao 1996). Alberti (2007) muestra que durante el tratamiento de la madera se genera un incremento inicial de los ácidos grasos insaturados (probablemente debido a la hidrólisis de los ésteres de esteroides) que posteriormente se degradan o se utilizan en rutas metabólicas. Los ácidos grasos generados a partir de la hidrólisis de triglicéridos están sujetos a degradación a través de varias vías, de las cuales la más importante y ampliamente distribuida es la β -oxidación

dando como resultado la eliminación sucesiva de dos unidades de carbono de un sustrato de acil-CoA derivado de ácidos grasos (Weete 1980, Gao 1996). En nuestro trabajo, tomamos un sobrenadante de cultivo libre de células por lo que no habría asimilación celular de los ácidos grasos pero si puede haber una proporción que corresponda a los producidos durante el cultivo de los hongos. Esto es variable, dependiendo de las condiciones de crecimiento y de la especie pero los principales ácidos grasos reportados en *Ophiostoma* son los ácidos linoleico, palmítico y oleico (Luara: linolénico) y podrían representar una pequeña fracción del total de ácidos grasos libres detectados. Varios estudios han demostrado que las enzimas proteolíticas son ampliamente producidas por *Ophiostoma spp.* y las actividades enzimáticas, como por ejemplo de las lipasas, podrían inhibirse (Abraham et al. 1993, Breuil et al. 1994).

Conclusiones

Se observó que todas las cepas mostraron actividad lipasa extracelular, siendo la cepa CIEFAPcc 475 de *Ophiostoma piliferum* la más destacada en términos de actividad tanto en medios líquidos como sólidos. Este hallazgo es consistente con estudios anteriores que también han identificado a otras cepas de *Ophiostoma piliferum* como productoras de lipasas de interés industrial. Incluimos además, el estudio del potencial de aislamientos de las especies nativas de la Patagonia, como *Ophiostoma grandicarpum*, *Ophiostoma nothofagi* y *Ophiostoma patagonicum*, siendo los primeros reportes de esta actividad para estas especies. Además, se encontraron diferencias significativas en la actividad lipolítica entre medios que contenían Tween 20 y Tween 80, sugiriendo que el Tween 20 podría ser un mejor indicador de actividad lipolítica en este contexto.

En términos de estabilidad enzimática, los resultados mostraron que la actividad lipolítica extracelular de las cepas estudiadas exhibe una mayor estabilidad a bajas temperaturas, una característica que posiblemente se relaciona con el hábitat natural de estos hongos y que es relevante para su potencial aplicación industrial bajo diversas condiciones. Además, se evidenció que tanto la selección del sustrato como el método de medición tienen un impacto significativo en los resultados de la actividad enzimática, lo que subraya la importancia de estandarizar y comparar adecuadamente los estudios. El análisis de los ácidos grasos libres en mezclas de reacción a baja temperatura, que contenían extracto liposoluble de la madera de *Nothofagus* y sobrenadantes extracelulares de cultivos de cepas patagónicas seleccionadas de *Ophiostoma*, reveló alteraciones en la abundancia relativa de ciertos ácidos grasos específicos. Esto sugiere que las lipasas producidas por estos hongos podrían estar

involucradas en la transformación de lípidos en la madera de *Nothofagus*, un proceso que podría influir en las interacciones con insectos que colonizan la madera y que merece ser explorado más a fondo. Finalmente, la diversidad biotecnológica observada en las cepas de *Ophiostoma* destaca su potencial para la producción de lipasas con aplicaciones industriales, así como la importancia de considerar múltiples factores en el diseño y ejecución de estudios enzimáticos para lograr resultados precisos y aplicables.

Conclusiones generales

En esta tesis se aporta información valiosa sobre diferentes hongos endófitos de la madera de plantines de *Nothofagus dombeyi* expuestos a déficit hídrico y al estrés causado por el hongo *Huntia decorticans* y a su interacción *in vitro* con este fitopatógeno. Específicamente, se ha detectado que algunos de los hongos aislados, como unos pertenecientes a *F. redolens* y *P. biciliata*, limitan el crecimiento micelial del fitopatógeno y que tienen capacidad de crecer en sistemas con bajo potencial agua, sugiriendo a estos hongos como biocontroladores de fitopatógenos para la producción forestal. Además, se determinó el potencial agua mínimo donde *H. decorticans* podría crecer, siendo más susceptible que otros hongos, esto podría estar relacionado con características de su ciclo de vida asociado a insectos y también a su patogenicidad ya que se ha observado que ante situación de estrés hídrico de la planta el patógeno es más virulento.

Se presenta el primer análisis de aislamientos de *Umbelopsis* asociados al bosque patagónico de *Nothofagus* utilizando criterios morfológicos y filogenéticos. Los aislamientos pertenecientes al complejo *Umbelopsis ramanniana* han revelado una capacidad diferencial para sintetizar enzimas con actividad lipolítica, siendo ello dependiente del sustrato empleado y las condiciones de cultivo. La cepa LPSc 521, aislada de la región más fría de Argentina, Tierra del Fuego, presenta características fisiológicas distintivas como un bajo nivel de lípidos saturados, que posiblemente esté relacionado a las condiciones del hábitat natural donde este hongo crece.

En esta tesis se dan a conocer datos inéditos sobre la capacidad de diferentes aislamientos de *Ophiostoma* asociados a la madera de ejemplares forestales de la Patagonia para sintetizar enzimas con actividad lipolítica, incluyendo cepas nativas correspondientes a *Ophiostoma grandicarpum*, *Ophiostoma nothofagi* y *Ophiostoma patagonicum*. También se encontró que la cepa CIEFAPcc 475 de *Ophiostoma piliferum* reveló los mayores niveles de actividad lipolítica sobre diferentes sustratos bajo diferentes condiciones de cultivo. Estudios de termoestabilidad y pruebas a bajas temperaturas sugieren que estos hongos son fuentes de enzimas capaces de transformar los compuestos lipofílicos de la madera de *Nothofagus*, lo cual puede tener relación con el rol que estos hongos cumplen en la interacción con insectos xilófagos y su potencial tecnológico en procesos a bajas temperaturas.

Bibliografía

- Abdeslahian, P., Kadier, A., Rai, P. K., & Silva, S. S. (2020). Lignocellulose as a Renewable Carbon Source for Microbial Synthesis of Different Enzymes. *Lignocellulosic Biorefining Technologies*, 185–202. Doi:10.1002/9781119568858.ch9
- Abraham, L., Hoffman, B., Gao, Y., & Breuil, C. (1998). Action of *Ophiostoma piceae* proteinase and lipase on wood nutrients. *Canadian journal of microbiology*, 44(7), 698-701.
- Adeleke, B. S., Ayilara, M. S., Akinola, S. A., & Babalola, O. O. (2022). Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 46.
- Akpınar-Bayazit, A. (2014). Fungal lipids: the biochemistry of lipid accumulation. *Int J Chem Eng Appl*, 5(5), 409-414.
- Alberdi, I. V. (2007). Estudio de los compuestos lipídicos durante la degradación de la madera de eucalipto por diferentes hongos: transformación de los extraíbles lipofílicos y síntesis de nuevos metabolitos fúngicos (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid)
- Alford, J. A., & Pierce, D. A. (1961). Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0 C. *Journal of Food Science*, 26(5), 518-524.
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F., & Dogru, M. (2007). Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 136(2), 183-192. <https://doi.org/10.1007/bf02686016>
- Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., ... & Gonzalez, P. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest ecology and management*, 259(4), 660-684.
- Amos, B. (1966) *Umbelopsis versiformis*, a new genus and species of the imperfects. *Mycologia* 58:805–808
- Angermayr, S. A., Pang, T. Y., Chevereau, G., Mitosch, K., Lercher, M. J., & Bollenbach, T. (2022). Growth-mediated negative feedback shapes quantitative antibiotic response. *Molecular systems biology*, 18(9), e10490.
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?. *Ecology*, 88(3), 541-549.
- Altschul, S., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

- Baselga, A., & Orme, C. D. L. (2012). betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods in ecology and evolution*, 3(5), 808-812.
- Bautista-Rosales, P. U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N. A., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control*, 65(3), 293-301.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., & Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(2), 133-153.
- Berestetskiy, A. O. (2008). A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, 453-465.
- Bhagyasree, S., Ghosh, S., Thippaiah, M., & Rajgopal, N. (2018). Survey on natural occurrence of endophytes in maize (*Zea mays* L.) ecosystem. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 7, 2526-2533.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101368. doi:10.1016/j.bcab.2019.101368
- Bhatt, P., Ahmad, S., Joshi, S., & Bhatt, K. (2022). Recent advancement in microbial enzymes and their industrial applications. In *Industrial applications of microbial enzymes* (pp. 1-17). CRC Press.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Lugtenberg, B. J., & Bloemberg, G. V. (2005). Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7), 710-721.
- Brahmachari, G. (2023). Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis, and industrial applications—an overview. *Elsevier eBooks* (pp. 1-10). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-19059-9.00026-8>
- Breuil, C., Yagodnik, C., & Abraham, L. (1994). Staining fungi growing in softwood produces proteinases and aminopeptidases.
- Byregowda, R., Prasad, S. R., Oelmüller, R., Nataraja, K. N., & Prasanna Kumar, M. K. (2022). Is endophytic colonization of host plants a method of alleviating drought stress? Conceptualizing the hidden world of endophytes. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 9194.
- Bruce, A., Lyall, C., Tait, J., & Williams, R. (2004). Interdisciplinary integration in Europe: the case of the Fifth Framework programme. *Futures*, 36(4), 457-470. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2003.10.003>
- Bruzone, M. C., Fontenla, S. B., Vohník, M. (2015) Is the prominent ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* absent in the Southern Hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity

- of root mycobionts in *Gaultheria* spp. from northwest Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza* 25(1):25–40. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0586-3>
- Buráňová L., Řezanka, T., & Jandera, A. (1990) Screening for strains of the genus *Mortierella*, showing elevated production of highly unsaturated fatty acids. *Folia Microbiol* 35(6):578–582. <https://doi.org/10.1007/BF02819994>
 - Burkert, J. F. M., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour Technol* 91(1):77–84. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00152-4)
 - Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. 2001. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. CABI.
 - Cabello, M. N. (1997) El género *Mortierella* (Zygomycotima, Mucorales) en Tierra del Fuego (Argentina). *Bol Soc Argent Bot* 33:53–58
 - Calderón, D.A., Aquino, M. D., Saparrat, M. C. N., García, C. C., Pildain, M. B.(2022). Capacidad antibacteriana de extractos de hongos endófitos de *Nothofagus dombeyi*. III Reunión Argentina de Micología. Córdoba, Argentina.
 - Cale, J. A., Ding, R., Wang, F., Rajabzadeh, R., & Erbilgin, N. (2019). Ophiostomatoid fungi can emit the bark beetle pheromone verbenone and other semiochemicals in media amended with various pine chemicals and beetle-released compounds. *Fungal Ecology*, 39, 285-295.
 - Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Prieto, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T. & Martínez, M.J. (2004) Hydrolysis of sterol esters by an esterase from *Ophiostoma piceae*: Application for pitch control in pulping of *Eucalyptus globulus* wood. *International Journal of Biotechnology* 6: 367-375.
 - Castaldi, S., Zorrilla, J. G., Petrillo, C., Russo, M. T., Ambrosino, P., Masi, M., ... & Istatico, R. (2023). *Alternaria alternata* isolated from infected pears (*Pyrus communis*) in Italy produces non-host toxins and hydrolytic enzymes as infection mechanisms and exhibits competitive exclusion against *Botrytis cinerea* in co-infected host fruits. *Journal of Fungi*, 9(3), 326.
 - Chatzifragkou A, Fakas S, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Aggelis G, & Papanikolaou S (2010) Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *Eur J Lipid Sci Technol* 112(9):1048–1057. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000027>
 - Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097-1108. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.11.040>

- Chemnitius, G.C., Erdmann, H., & Schmid, R.D. (1992) Solubilized substrates for the on-line measurement of lipases by flow injection analysis during chromatographic enzyme purification. *Anal Biochem* 202(1):16–24. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90199-H](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90199-H)
- CIEFAP - MADyS. (2016). Actualización de la Clasificación de Tipos Forestales y Cobertura del Suelo de la Región bosque andino patagónico. Informe Final. CIEFAP. En Informe final (p.122). <https://drive.google.com/open?id=0BxfNQutfxxeaUHNcQm9lYmk5RnM>
- Clarke, R. W., Jennings, D. H., & Coggins, C. R. (1980). Growth of *Serpula lacrimans* in relation to water potential of substrate. *Transactions of the British Mycological Society*, 75(2), 271-280.
- Colen, G., Junqueira, R.G., & Moraes-Santos, T. (2006) Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J Microbiol Biotechnol* 22(8):881–885
- Collins, T., Gerday, C. (2017) Enzyme catalysis in psychrophiles. In: *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer, Cham, pp 209–235. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9118-9>
- Collins, T., & Feller, G. (2023). Psychrophilic enzymes: strategies for cold-adaptation. *Essays in Biochemistry*, 67(4), 701-713.
- Contardi L. T. & de Errasti A. (2012). Evolución de la temperatura en pilas de compostaje de residuos agroforestales. En: Congreso Medio ambiente AUGM. La Plata Argentina. 16 p.
- Couto, S. R., & Sanromán, M. A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 211-219.
- Cui, J. L., Vijayakumar, V., & Zhang, G. (2018). Partitioning of fungal endophyte assemblages in root-parasitic plant *Cynomorium songaricum* and its host *Nitraria tangutorum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 666.
- Czumaj A, & Śledziński T (2020) Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease. *Nutrients* 12(2):356. <https://doi.org/10.3390/nu12020356>
- Dang, S. Z., Cao, S., Hu, J. L., & Li, Y. Z. (2022). Specific primers of *Paraphoma radicina* which causes alfalfa *Paraphoma* root rot. *European Journal of Plant Pathology*, 1-11.
- Daub, M. E., & Chung, K. R. (2009). Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis. In *Plant relationships* (pp. 201-219). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- De Beer, Z. W., Duong, T. A., & Wingfield, M. J. (2016). The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Studies in mycology*, 83(1), 165-191.
- de Errasti, A., De Beer, Z. W., Rajchenberg, M., Coetzee, M. P. A., Wingfield, M. J., & Roux, J. (2015). *Huntia decorticans* sp. nov. (Ceratocystidaceae) associated with dying *Nothofagus* in Patagonia. *Mycologia*, 107(3), 512-521.

- de Errasti, A. (2016). Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y nativas de los Andes patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x> Crossref, Medline, ISI, Google Scholar
- Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., ... & Saxena, A. K. (2020). Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 147-161). Elsevier.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, & Robledo C (2010) Infostat - Software estadístico. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>
- Díaz, J., Silvar, C., Varela, M. M., Bernal, A., & Merino, F. (2005). *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. *Plant Pathology*, 54(6), 773-780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01285.x>
- Domínguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 2003;25:1225–9
- Dong, X., Ling, N., Wang, M., Shen, Q., & Guo, S. (2012). Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 171-179.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Durán, E. L., Ploper, L. D., Ramallo, J. C., Piccolo Grandi, R. A., Hupper Giancoli, Á. C., & Azevedo, J. L. (2005). The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. *Canadian Journal of Botany*, 83, 350–355.
- Dzurendova S, Zimmermann B, Kohler A, Tafintseva V, Slany O, Certik M, & Shapaval V (2020) Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced co-production of high-value metabolites in oleaginous Mucoromycota fungi. *PLoS ONE* 15(6):e0234870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245016>
- Eamus, D., & Jennings, D. H. (1986). Water, turgor and osmotic potentials of fungi. *Water, fungi and plants*, 27-48.

- Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., ... & Watkinson, S. C. (2011). The plant cell wall–decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science*, 333(6043), 762-765.
- Economou CN, Aggelis G, Pavlou S, & Vayenas DV (2011) Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresour Technol* 102(20):9737–9742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.025>
- El-Baz, H.A., Elazzazy, A.M., Saleh, T.S., Dritsas, P., Mahyoub, J.A., Baeshen, M.N., Madian, H.R., Alkhaled, M., & Aggelis, G. (2021) Single cell oil (SCO)–based bioactive compounds: I—enzymatic synthesis of fatty acid amides using SCOs as acyl group donors and their biological activities. *Appl Biochem Biotechnol* 193(3):822–845. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03450-3>
- Eliades, L.A., Cabello, M.N., Pancotto, V., Moretto, A., Ferreri, N.A., Saparrat, M.C., & Barrera, M.D. (2019) Soil mycobiota under managed and unmanaged forests of *Nothofagus pumilio* in Tierra del Fuego, Argentina. *N Z J For Sci* 49. <https://doi.org/10.33494/nzjfs492019x53x>
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Taleb, A.T., & Adinarayana, K. (2004) Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochem* 39(5):525–528. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00340-5)
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2009) Biochemistry and biotechnology of single cell oil. In Pandey A, Larroche C (eds) *New horizons in biotechnology*. Asiatech Publishers, pp 38–60
- Farrell, R. L., Blanchette, R. A., Brush, T. S., Hadar, Y., Iverson, S., Krisa, K., ... & Zimmerman, W. (1993). Cartapip™: a biopulping product for control of pitch and resin acid problems in pulp mills. *Journal of Biotechnology*, 30(1), 115-122.
- Félix, C., Libório, S., Nunes, M., Félix, R., Duarte, A. S., Alves, A., & Esteves, A. C. (2018). *Lasiodiplodia theobromae* as a Producer of Biotechnologically Relevant Enzymes. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 29.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure*. Reactions, 613, 1960-1982.
- Fischer, C., & Höll, W. (1992). Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fat reserves in pine wood. *Trees*, 6, 147-155.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497–509
- Fontana D. C., de Paula S., Torres A. G. , de Souza V. H. M. , Pascholati S. F. , Schmidt D., Neto D. D. (2021). Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. *Pathogens* 10 (5): 570. DOI: 10.3390/pathogens10050570.

- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 337-359.
- Gamboa-Gaitán, M. A. (2006). HONGOS ENDÓFITOS TROPICALES: CONOCIMIENTO ACTUAL y PERSPECTIVAS. *Acta Biológica Colombiana/Acta BiolóGica Colombiana*, 11, 3-20. <https://biblat.unam.mx/es/revista/acta-biologica-colombiana/articulo/hongos-endofitos-tropicales-conocimiento-actual-y-perspectivas>
- Gao, Y. (1996). Biodegradation of lipids by wood sapstaining *Ophiostoma* spp (Doctoral dissertation, University of British Columbia).
- Gardeli, C., Athenaki, M., Xenopoulos, E., Mallouchos, A. K. A. A., Koutinas, A.A., Aggelis, G., & Papanikolaou S (2017) Lipid production and characterization by *Mortierella* (*Umbelopsis*) *isabellina* cultivated on lignocellulosic sugars. *J Appl Microbiol* 123(6):1461–1477. <https://doi.org/10.1111/jam.13587>
- Garlapati, V.K., & Banerjee, R.. (2010) Optimization of lipase production using differential evolution. *Biotechnol Bioprocess Eng*;15:254–60.
- Gaspar, M.L., Cunningham, M., Pollero, R., & Cabello, M. (1999) Occurrence and properties of an extracellular lipase in *Mortierella vinacea*. *Mycologia* 91(1):108–113. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12060997>
- Gazis, R., & Chaverri, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *fungus ecology*, 3(3), 240-254.
- Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K. & Brandt, M.E. et al. (2013) One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103, 400–408.
- Geoffry, K., & Achur, R. N. (2018). Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 14, 241-253. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>
- George, E., Tamerler, C., Martinez, A., Martinez, M. J., & Keshavarz, T. (1999). Influence of growth medium composition on the lipolytic enzyme activity of *Ophiostoma piliferum* (Cartapip™). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74(2), 137-140.
- Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G. C., Miserere, L., & Nicolotti, G. (2009). Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*, 38, 69–83.

- Godoy, M.G., Gutarra, M.L.E., Castro, A.M., Machado, O.L.T., Freire, D.M.G.(2011). Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. J Ind Microbiol Biotechnol; 38:945–53.
- Grantina-Ievina L, Berzina A, Nikolajeva V, Mekss P, & Muiznieks I (2014) Production of fatty acids by *Mortierella* and *Umbelopsis* species isolated from temperate climate soils. Environ Exp Biol 12:15–27
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., ... & Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology, 63(8), 3189-3198.
- Gunatilaka, A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. Journal of Natural Products, 69(3), 509-526.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., & Bradoo, S. (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology And Applied Biochemistry Online/Biotechnology And Applied Biochemistry, 37(1), 63-71. <https://doi.org/10.1042/ba20020059>
- Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., ... & Ezeji, T. (2016). Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. Trends in biochemical sciences, 41(7), 633-645.
- Gutiérrez, A., Río, J. D., González-Vila, F. J., & Martín, F. (1999). Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood.
- Gutiérrez, A. (2001). The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends In Biotechnology, 19(9), 340-348. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(01\)01705-x](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(01)01705-x)
- Gutierrez A., Rio J. C., & Martinez A.T. (2010) Fungi and their enzymes for pitch control in the pulp and paper industry. In: Hofrichter M, editor. Industrial applications. The Mycota (A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research). Berlin, Heidelberg: Springer, 2010:237–377
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., & Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay between innate immunity and the plant microbiota. Annual review of Phytopathology, 55(1), 565-589.
- Hafizoğlu, H., & Holmbom, B. (1987). Studies on the chemistry of *Cedrus libani* A. rich.-III. oleoresin composition of cones and bark from *Cedrus libani*.
- Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67(3):597–607. <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019782>

- Hansson L, & Dostalek (1988) Effect of culture conditions on mycelial growth and production of gamma-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. Appl Microbiol Biotechnol 28:240–246. <https://doi.org/10.1007/BF00250448>
- Harris, R. F. (1981). Effect of water potential on microbial growth and activity. Water potential relations in soil microbiology, 9, 23-95.
- Harrison, J. G., & Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? Environmental Microbiology, 22(6), 2107-2123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14968>
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb Technol 39:235–251
- Hasan F, Shah AA, & Hameed A (2009) Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. Biotechnol Adv 27(6):782–798
- Herbert, R. A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. Trends in Biotechnology, 10, 395-402.
- Hernández-Ochoa, J. S., Levin, L. N., Hernández-Luna, C. E., Contreras-Cordero, J. F., Niño-Medina, G., Abelardo, C. M., ... & Gutiérrez-Soto, G. (2020). Antagonistic potential of *Macrolepota* sp. against *Alternaria Solani* as causal agent of early blight disease in tomato plants. Gesunde Pflanzen, 72(1), 69-76.
- Herrera, P., Navarrete, J., & Werner, E. (2015). Adaptation of the tween 80 assay with a resolution V fractional factorial design and its application to rank *Ophiostoma* fungi with wood extractive degrading capabilities. Maderas. Ciencia y tecnología, 17(1), 85-98.
- Hillis, W. E. (1962). The distribution and formation of polyphenols within the tree. In Wood extractives and their significance to the pulp and paper industries (pp. 59-131). Academic Press.
- Híreš, M., Rapavá, N., Šimkovič, M., Varečka, L., Berkeš, D., & Kryštofová, S. (2018) Development and optimization of a high-throughput screening assay for rapid evaluation of lipstatin production by *Streptomyces* strains. Curr Microbiol 75(5):580–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1420-x>
- Holmquist, M. (2000). Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. Current Protein And Peptide Science/Current Protein & Peptide Science, 1(2), 209-235. <https://doi.org/10.2174/1389203003381405>
- Hossain, M., Veneklaas, E. J., Hardy, G. E. S. J., & Poot, P. (2019). Tree host–pathogen interactions as influenced by drought timing: linking physiological performance, biochemical defence and disease severity. Tree Physiology, 39(1), 6-18.

- Huang, Q., An, H., Song, H., Mao, H., Shen, W., & Dong, J. (2015). Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. *Research in microbiology*, 166(1), 45-55.
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., & Ko Ko, T. W. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97, 1-136. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>
- Hynes M (2010) Gluconeogenesis. In: Borkovich KA, Ebbole DJ (eds) *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington, DC, ASM Press, pp 312–324. <https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch22>
- Iftikhar T, Niaz M, Jabeen R, Haq IU (2011) Purification and characterization of extracellular lipases. *Pak J Bot* 43(3):1541–1545
- Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. *Biocontrol Science and Technology*, 27(1), 28-41.
- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.
- James, R. L., Perez, R., Dumroese, R. K., & Wenny, D. L. (2000). Virulence of *Fusarium oxysporum* on Douglas-fir germinants: comparison of isolates from nursery soil and roots of healthy and diseased seedlings. In *Proceedings of the 4th Meeting of IUFRO Working Party* (Vol. 7, No. 04, pp. 49-64).
- Jankowiak, R., Bilański, P., Strzałka, B., Linnakoski, R., Bosak, A., & Hausner, G. (2019). Four new *Ophiostoma* species associated with conifer-and hardwood-infesting bark and ambrosia beetles from the Czech Republic and Poland. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112, 1501-1521.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H. L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. P. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in microbiology*, 7, 906.
- Jin, H., Yan, Z., Liu, Q., Yang, X., Chen, J., & Qin, B. (2013). Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104, 949-963.
- Jin, M., Slininger, P. J., Dien, B. S., Waghmode, S., Moser, B. R., Orjuela, A., ... & Balan, V. (2015). Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in biotechnology*, 33(1), 43-54.
- Johnson, T., & Miller, R. (2012). Environmental factors influencing endophytic fungal growth. *Fungal Ecology*, 4(2), 123-130.
- Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv.*;26:457–70

- Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2018). Endophytic yeasts: Biology, ecology and applications. *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*, 3-14.
- Kanmani P, Aravind J, & Kumaresan K (2015) An insight into microbial lipases and their environmental facet. *Int J Environ Sci Technol* 12:1147–1162. <https://doi.org/10.1007/s13762-0140605-0>
- Kashmiri, M.A., Adnan, A., & Butt, B.W. (2006) Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *Afr J Biotechnol* 5(10):878–882. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i10.42916>
- Kavitha, M. (2016). Cold active lipases—an update. *Frontiers in life Science*, 9(3), 226-238.
- Kempka, A. P., Lipke, N. L., da Luz Fontoura Pinheiro, T., Menoncin, S., Treichel, H., Freire, D. M., ... & de Oliveira, D. (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31, 119-125.
- Kennedy, M. J. , Reader, S. L., & Davies, R. J. (1993) Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnol Bioeng* 42(5):625–634. <https://doi.org/10.1002/bit.260420511>
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unravelling the efficient use of organic waste by microbial inoculants for sustainable agriculture. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(8), 1041-1055. <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.863637>
- Keyhani, N. O. (2018) Lipid biology in fungal stress and virulence: entomopathogenic fungi. *Fungal Biol* 122(6):420–429. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.003>
- Khan, A. L., Shahzad, R., Al-Harrasi, A., & Lee, I. J. (2017). Endophytic microbes: a resource for producing extracellular enzymes. In *Endophytes: Crop Productivity and Protection* (pp. 95-110). Springer, Cham.
- Khunyoshyeng S, Cheevadhanarak S, Rachdawong S, & Tanticharoen M (2002) Differential expression of desaturases and changes in fatty acid composition during sporangiospore germination and development in *Mucor rouxii*. *Fungal Genet Biol* 37(1):13–21. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00028-2)
- Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- Klempova, T., Basil, E., Kubatova, A., Certik, M. (2013) Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta-carotene by Zygomycetes fungi. *Biotechnol J* 8(7):794–800. <https://doi.org/10.1002/biot.201200099>

- Klepzig, K. D., Flores-Otero, J., Hofstetter, R. W., & Ayres, M. P. (2004). Effects of available water on growth and competition of southern pine beetle associated fungi. *Mycological Research*, 108(2), 183-188.
- Köhl, J., Gerlagh, M., & Grit, G. (2000). Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of cyclamen. *Plant disease*, 84(5), 569-573.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M., & Reinikainen, T. (2006). Purification and characterisation of a novel sterol esterase from *Melanocarpus albomyces*. *Enzyme and microbial technology*, 39(2), 265-273.
- Kosa G, Zimmermann B, Kohler A, Ekeberg D, Afseth NK, Mounier J, Shapaval V (2018) High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. *Biotechnol Biofuels* 11(1):1–17
- Kotogán, A., Zambrano, C., Kecskeméti, A., Varga, M., Szekeres, A., Papp, T., ... & Takó, M. (2018). An organic solvent-tolerant lipase with both hydrolytic and synthetic activities from the oleaginous fungus *Mortierella echinosphaera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1129.
- Korkama-Rajala, M. M. Müller, & T. Pennanen.(2014) Decomposition and fungi of needle litter from slow- and fast-growing Norway spruce (*Picea abies*) clones. *Microbial Ecology*, 56(1):76–89, 2008
- Koutinas AA, Chatzifragkou A, Kopsahelis N, Papanikolaou S, & Kookos IK (2014) Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 116:566–577. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.045>
- Kumar, D. S. S., & Hyde, K. D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17, 69–90.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X:molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molec Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumar, A., Verma, V., Dubey, V. K., Srivastava, A., Garg, S. K., Singh, V. P., & Arora, P. K. (2023). Industrial applications of fungal lipases: a review. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1142536.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 19(7), 792-798.
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 19(7), 792-798.
- Lalremruati, F., Lalhriatpuii, N., Fanai, A., Bohia, B., Lalrokimi, Lalmuanpuii, R., ... & Zothanpuia. (2024). Fungal Endophytes as Biocontrol Agents of Plant Pathogens: Recent

Developments and Prospects. Endophytic Fungi: The Hidden Sustainable Jewels for the Pharmaceutical and Agricultural Industries, 279-294.

- Lana, T. G., Azevedo, J. L. D., Pomella, A. W., Monteiro, R. T. R., Silva, C. B., & Araújo, W. L. D. (2011). Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genet Mol Res*, 10(1), 326-334.

- Langseter, A. M., Dzurendova, S., Shapaval, V., Kohler, A., Ekeberg, D., & Zimmermann, B. (2021). Evaluation and optimisation of direct transesterification methods for the assessment of lipid accumulation in oleaginous filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-15.

- Larrán, S., Perello, A., Simón, M. R., & Moreno, V. (2002). Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 683-686.

- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., Lakshmipriya, T., & Tang, T. H. (2015) Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *Biomed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2015/820575>

- Lee, J. M., Lee, H., Kang S, & Park. W. J. (2016) Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients* 8(1):23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>

- Li, J. Y., & Strobel, G. A. (2001). Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*, 57(2), 261-265.

- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>

- Li, F., Chen, L., Redmile-Gordon, M., Zhang, J., Zhang, C., Ning, Q., & Li, W. (2018). *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land degradation & development*, 29(6), 1642-1651.

- Liao, X., O'Brien, T.R., Fang, W., St. Leger, R.J., 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7089–7096.

- Lindahl, B. D., & Tunlid, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi—potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist*, 205(4), 1443-1447. doi:10.1111/nph.13201

- Liu, W. H., Beppu, T., & Arima, K. (1973). Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(1), 157-163.

- Liu, Y. Y., Xu, J. H., Hu, Y. (2000) Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J Mol Catal B Enzym* 10(5):523–529. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00093-X)
- Liu, S., Li, J., Zhang, Y., Liu, N., Viljoen, A., Mostert, D., Zuo, C., Hu, C., Bi, F., Gao, H., Sheng, O., Deng, G., Yang, Q., Dong, T., Dou, T., Yi, G., Ma, L., & Li, C. (2020). Fusaric acid instigates the invasion of banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense TR 4. *New Phytologist*, 225(2), 913-929.
- Lopez, D.C., Sword, G.A., 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biol. Control* 89, 53–60.
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18(5), 5891-5935.
- Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., Gokhale, D. V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 38: 715-721.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121-186.
- Mahoney, D., Gams, W., Meyer, W., & Starink-Willemse, M. (2004). *Umbelopsis dimorpha* sp. nov., a link between *U. vinacea* and *U. versiformis*. *Mycological research*, 108(1), 107-111.
- Mandyam, K., & Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in mycology*, 53(1), 173-189.
- Manion, P. D. (2003). Evolution of concepts in forest pathology. *Phytopathology*, 93(8), 1052-1055.
- Markweg-Hanke, M., Lang, S., & Wagner, F., (1995). Dodecanoic acid inhibition of a lipase from *Acinetobacter* sp. OPA 55. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 512±516
- Masera, P., Pildain, M. B., Aquino, M., De Errasti, A., Dalla Salda, G., Rajchenberg, M., & Urretavizcaya, M. F. (2023). Effect of *Huntia decorticans* and drought on *Nothofagus dombeyi* seedlings. *AoB Plants*, 15(5), plad068.
- Martínez, M. J., Barrasa, J. M., Gutiérrez, A., Carlos del Río, J., & Martínez, A. T. (2000). Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* wood. *Canadian Journal of Botany*, 77(10), 1513-1522.
- Martínez O, & Valenzuela E (2003) Zygomycota citados para Chile. *Boletín Micológico* 18

- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R. A., Sanz-Ros, A. V., Pando, V., & Diez, J. J. (2016). Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control*, 94, 1-10.
- Mayordomo, I., Randez Gil, F., Prieto, J.A. (2000). Isolation, Purification and Characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 105-109.
- Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8, 58
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>
- Menkis, A., & Vasaitis, R. (2010). Fungi in Roots of Nursery Grown *Pinus sylvestris*: Ectomycorrhizal Colonisation, Genetic Diversity and Spatial Distribution. *Microbial Ecology*, 61(1), 52–63. doi:10.1007/s00248-010-9676-8
- Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A. F. S., Stenström, E., Stenlid, J., & Finlay, R. (2005). Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant pathology*, 55(1), 117-129.
- Meyer W, & Gams W (2003) Delimitation of Umbelopsis (Mucorales, Umbelopsidaceae fam. Nov.) based on ITS sequence and RFLP data. *Mycol Res* 107(3):339–350.
<https://doi.org/10.1017/S0953756203007226>
- Mirza, A. Q., Akhtar, M. W., Nawazish, M. N., & Chughtai, M. I. D. (1982) Production of lipids and lipase activity during growth of *Mucor hiemalis*. *Can J Microbiol* 28(6):618–622.
<https://doi.org/10.1139/m82-092>
- Molina, L., Rajchenberg, M., de Errasti, A., Aime, M. C., & Pildain, M. B. (2020). Sapwood inhabiting mycobiota and *Nothofagus* tree mortality in Patagonia: Diversity patterns according to tree species, plant compartment and health condition. *Forest Ecology and Management*, 462(February), 117997. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117997>
- Moron, L. S., Lim, Y. W., & Dela Cruz, T. E. E. (2018). Antimicrobial activities of crude culture extracts from mangrove fungal endophytes collected in Luzon Island, Philippines. *Philipp Sci Lett*, 11, 28-36.
- Murphy D (1991) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog Lipid Res* 29:299–324
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal/TheScientificWorldjournal*, 2014, 1-11.
<https://doi.org/10.1155/2014/250693>

- Naqvi, S.H., Dahot, M.U., Ali, A., Khan, Y., & Rafiq, M. (2011) Production and characterization of extracellular lipase secreted by *Mucor geophyllus*. Afr J Biotechnol 10(84):19589–19606. <https://doi.org/10.5897/ajb11.216>
- Ncube I, Adlercreutz P, Read J, & Mattiasson B (1993) Purification of rape (*Brassica napus*) seedling lipase and its use in organic media. Biotechnol Appl Biochem 17:327–336
- Nwuche, C.O., & Ogbonna, J.C., (2011). Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. Brazilian Arch. Bio. Technol. 54, 113-116
- Neto, C. P., Freire, C. S., Pinto, P. C., Santiago, A.S., Silvestre, A. J., & Evtuguin DV (2006) Comparative study of lipophilic extractives of hardwoods and corresponding ECF bleached kraft pulps. BioResources 1(1):3–17
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., ... & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal ecology, 20, 241-248.
- Ochsenreither K, Glück C, Stressler T, Fischer L, & Sylatk C (2016) Production strategies and applications of microbial single cell oils. Front Microbiol 7:1539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01539>
- Ogawa Y, Suda A, Kusama-Eguchi K, Watanabe K, & Tokumasu S (2005) Intraspecific groups of *Umbelopsis ramanniana* inferred from nucleotide sequences of nuclear rDNA internal transcribed spacer regions and sporangiospore morphology. Mycoscience 46(6):343–351. <https://doi.org/10.1007/s10267-005-0257-5>
- Ogawa, Y., Sugiyama, M., Hirose, D., Kusama-Eguchi, K., & Tokumasu, S. (2011) Polyphyly of intraspecific groups of *Umbelopsis ramanniana* and their genetic and morphological variation. Mycoscience 52(2):91–98. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0074-3>
- Olivera, N. L., Libkind, D., & Donati, E.. (2016). Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms. Springer International Publishing.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H., & Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. Protein Engineering, Design & Selection, 5(3), 197-211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>
- Orole, O.O., & Adejumo, T.O., (2009). Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. African J. Microbiol. Res. 3, 969–973.
- Ottosson, E. (2013). Succession of wood-inhabiting fungal communities, Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences .Acta Universitatis agriculturae Sueciae 2013:17. Uppsala.

- Ovando, L; Damon, A.; Bello, R.; Ambrosio, D.; Albores, V.; Adriano, L.; y Salvador, M. (2005). Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potencial for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. Asian J. Planto Sci. 4:309 – 315.
- Packer, A., & Clay, K. (2000). Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. Nature, 404(6775), 278-281.
- Panteghini M, Bonora R, & Pagani F (2001) Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. Ann Clin Biochem 38(4):365–370. <https://doi.org/10.1258/0004563011900876>
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. European Journal of Lipid Science and Technology, 109(11), 1060-1070.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2019). Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35, 1-19.
- Patel, A., Arora, N., Sartaj, K., Pruthi, V., Pruthi, P.A. (2016) Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. Renew Sust Energ Rev 62:836–855. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.014>
- Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2020). An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. Microorganisms, 8(3), 434.
- Peng, W., Lamei, Z., Zhiming, Z. H., Li, W., Hui, W., Chengling, Y., & Guohong, G. (2011). Microbial Lipid Production by Co-Fermentation with *Mortierella alpina* obtained by Ion Beam Implantation. Chemical Engineering & Technology, 34(3), 422-428.
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., ... & Xu, B. L. (2021). Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. Frontiers in Microbiology, 12, 670135.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In Microbial ecology of leaves (pp. 179-197). New York, NY: Springer New York.
- Pildain, M.B., Coetzee, M. P .A., Rajchenberg, M., Petersen, R. H., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2009). Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes. Mycological Progress, 8(3), 181-194.
- Pildain, M. B., Coetzee, M., Wingield, B., Wingfield, M., & Rajchenberg, M. (2010). Taxonomy of *Armillaria* in the Patagonian forests of Argentina. Mycologia 102: 392-403. ISSN 0027-5514.
- Ploetz, R. C. (2013). The Impact of *Fusarium* Wilt in the History of Panama Disease of Banana. Phytopathology, 103(10), 976-985.

- Plou, F. J., Ferrer, M., Nuero, O. M., Calvo, M. V., Alcalde, M., Reyes, F., & Ballesteros A (1998) Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol Tech* 12(3):183–186. <https://doi.org/10.1023/A:1008809105270>
- Posit Team. 2023. RStudio: Integrated development environment for R. Boston, MA: Posit Software, PBC. <http://www.posit.co/>
- Qiang, S., Wang, L., Wei, R., Zhou, B., Chen, S., Zhu, Y., ... & An, C. (2010). Bioassay of the Herbicidal Activity of AAC-Toxin Produced by *Alternaria alternata* Isolated from *Ageratina adenophora*. *Weed Technology*, 24(02), 197–201. doi:10.1614/wt-d-09-00016.1
- Qin D, Wang L, Han M, Wang J, Song H, Yan X, Duan X, & Dong J (2018) Effects of an endophytic fungus *Umbelopsis dimorpha* on the secondary metabolites of host-plant *Kadsura angustifolia*. *Front Microbiol* 9:2845. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02845>
- Quereshi, S., Khan, N. A., & Pandey, A. K. (2011). Anthraquinone pigment with herbicidal potential from *Phoma herbarum* FGCC# 54. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 521-523.
- Radwan, S. S. (1991). Sources of C 20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 421-430.
- Rahman, M. Z., Ahmad, K., Bashir Kutawa, A., Siddiqui, Y., Saad, N., Geok Hun, T., ... & Hossain, M. I. (2021). Biology, diversity, detection and management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing vascular wilt disease of watermelon (*Citrullus lanatus*): a review. *Agronomy*, 11(7), 1310.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Capretti, P., Dellavalle, I., & Turco, E. (2003). Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *Forest Pathology*, 33(1), 31-38.
- Rajchenberg, M. 2006. Los políporos (Basidiomycetes) de los bosques andino patagónicos de Argentina.
- Rajchenberg M, Pildain MB, Bianchinotti MV, & Barroetaveña C. (2015). The phylogenetic position of poroid Hymenochaetaceae (Hymenochaetales, Basidiomycota) from Patagonia, Argentina. *Mycologia* 107: 754-767. ISSN 0027-5514.
- Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, V., ... & Saxena, A. K. (2019). Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. *Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges*, 105-144.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. En Springer eBooks (pp. 235-291). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2109-9_9
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.

- Rayner, A. D. M., & Boddy, L. (1988). Fungal Decomposition of Wood: Its Biology and Ecology. John Wiley & Sons.
- Reetz, M. T. (2002). Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts. *Tetrahedron*, 58(32), 6595-6602.
- Rivero-Cruz, J. F., García-Aguirre, G., Cerda-García-Rojas, C. M., & Mata, R. (2000). Conformational behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma herbarum*. *Tetrahedron*, 56(30), 5337-5344.
- Robinson CH (2001) Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol* 151:341–353. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00177.x>
- Rodriguez, J. A., Mateos, J. C., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., ... & Baratti, J. (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(11), 2264–2269. doi:10.1016/j.procbio.2006.05.017
- Rodriguez R & Redman R (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J Exp Bot* 59:1109–1114
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., ... & Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME journal*, 2(4), 404-416.
- Romanya, J., Fons, J., Sauras-Year, T., Gutiérrez, E., Vallejo, V. R. (2005) Soil–plant relationships and tree distribution in old growth *Nothofagus betuloides* and *Nothofagus pumilio* forests of Tierra del Fuego. *Geoderma* 124(1–2):169–180. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.04.011>
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, & Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ronseaux, S., Clément, C., & Ait Barka, E. (2013). Interaction of *Ulocladium atrum*, a potential biological control agent, with *Botrytis cinerea* and grapevine plantlets. *Agronomy*, 3(4), 632-647.
- Roux, J., & Wingfield, M. J. (2009). Ceratocystis species: emerging pathogens of non-native plantation *Eucalyptus* and *Acacia* species. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 71(2), 115-120.
- Royse, D. J., & Ries, S. M. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68(4), 603-607.
- Ruan, Z., Zanotti, M., Wang, X., Ducey, C., & Liu, Y. (2012). Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 110, 198-205.

- Rugolo, M. (2018). Ensayos de producción, caracterización enzimática y obtención de exopolisacáridos de hongos comestibles lignocelulolíticos patagónicos en sustratos provenientes de desechos herbáceos, agrícolas y forestales.
- Russell NJ (2008) Membrane components and cold sensing. In: Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 177–190. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4_11
- Salameh, M. D., & Wiegel, J. (2007) Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Adv Appl Microbiol* 61:253–283. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)61007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)61007-1)
- Salem, M. Z., Nasser, R. A., Zeidler, A., Elansary, H. O., Aref, I. M., Böhm, M., ... & Ahmed, A. I. (2015). Methylated fatty acids from heartwood and bark of *Pinus sylvestris*, *Abies alba*, *Picea abies*, and *Larix decidua*: Effect of strong acid treatment. *BioResources*, 10(4), 7715-7724.
- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36–44. doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.0
- Sanmartín, I., & Ronquist, F. (2004). Southern Hemisphere Biogeography Inferred by Event-Based Models: Plant versus Animal Patterns. *Systematic Biology*, 53(2), 216–243. doi:10.1080/10635150490423430
- Santamaría, O., González, M.A., Pajares, J.A., & Diez, J.J., (2007). Effect of fungicides, endophytes and fungal filtrates on in vitro growth of Spanish isolates of *Gremmeniella abietina*. *For. Pathol.* 37, 251–262.
- Santek, M. I., Beluhan, S., & Santek, B. (2018). Production of Microbial Lipids from Lignocellulosic Biomass. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74013>
- Saranpää, P., & Nyberg, H. (1987). Lipids and sterols of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. *Trees*, 1, 82-87.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*. doi:10.1038/s41559-018-0793-y
- Sayari, M., van der Nest, M. A., Steenkamp, E. T., Rahimlou, S., Hammerbacher, A., & Wingfield, B. D. (2021). Characterization of the Ergosterol Biosynthesis Pathway in Ceratocystidaceae. *Journal of Fungi*, 7(3), 237.
- Schulz, B., Römmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J., & Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. *Mycological Research*, 103(10), 1275-1283.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K., & Krohn, K. (2005). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*, 106(9), 996-1004.

- Seifert, K. A., & Grylls, B. T. (1990). A survey of sapstaining fungi of Canada. Forintek Canada, Ottawa.
- Shah, S. H., & Nasr, M. (2020). Fungal bioprospecting for sustainable biofuel production: opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 133, 110266. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110266>
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.
- Sharma, P., Meena, P. D., Meena, R. S., & Jadon, S. S. (2016). Sustainable management of soil-borne phytopathogens using antagonistic fungi. *In S. Meena, A. Kamble, J. S. Patel, D. P. Singh, & H. Pathak (Eds.), *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 273-296). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_12
- Shimizu S, & Jareonkitmongkol S (1995) *Mortierella* species (Fungi): production of C 20 polyunsaturated fatty acids. In: *Medicinal and Aromatic Plants VIII*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 308–325
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 75-89. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>
- Silvar, C., Merino, F., & Díaz, J. (2009). Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes. *Plant biology*, 11(1), 68-74.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. doi:10.1007/s13205-016-0485-8
- Sitholé, B. B., Sullivan, J. L., & Allen, L. H. (1992). Identification and quantitation of acetone extractives of wood and bark by ion exchange and capillary GC with a spreadsheet program.
- Six, D. L., & Wingfield, M. J. (2011). The role of phytopathogenicity in bark beetle–fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual review of entomology*, 56(1), 255-272.
- Smith, J., Brown, P., & Williams, K. (2010). Cultivation techniques for endophytic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 65(3), 215-222.
- Soal, N. C., Coetzee, M. P., van der Nest, M. A., Hammerbacher, A., & Wingfield, B. D. (2022). Phenolic degradation by catechol dioxygenases is associated with pathogenic fungi with a necrotrophic lifestyle in the Ceratocystidaceae. *G3*, 12(3), jkac008.
- Soltani, J., & Hosseyni Moghaddam, M. S. (2014). Antiproliferative, antifungal, and antibacterial activities of endophytic *Alternaria* species from Cupressaceae. *Current microbiology*, 69, 349-356.
- Soteras F, Ibarra C, Geml J, Barrios-García MN, Domínguez LS, Nouhra ER (2017) Mycophagy by invasive wild boar (*Sus scrofa*) facilitates dispersal of native and introduced mycorrhizal fungi in Patagonia, Argentina. *Fungal Ecol* 26:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.008>

- Song Z, Liu G, Chen Z, Liu B, Liu X (2019) Preliminary study on fatty acid composition of *Umbelopsis*. J Fungal Res 17(1):35–42
- Stamatakis A (2014) RAxML 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 101093/bioinformatics/btu033
- Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Assi, L., & Schwan-Estrada, K. R. F. (2011). Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex, 2, 1033-1042.
- Stark S, Hilli S, Willför S, Smeds AI, Reunanen M, Penttinen M, & Hautajärvi R (2012) Composition of lipophilic compounds and carbohydrates in the accumulated plant litter and soil organic matter in boreal forests. Eur J Soil Sci 63(1):65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2011.01411.x>
- Stenström, E., Ndobe, N. E., Jonsson, M., Stenlid, J., & Menkis, A. (2013). Root-associated fungi of healthy-looking *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings in Swedish forest nurseries. Scandinavian Journal of Forest Research, 29(1), 12–21. doi:10.1080/02827581.2013.844850
- Stone, J. K., Polishook, J. D., & White, J. F. (2004). Endophytic fungi. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, 241, 270.
- Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M., & Bajpai, R. (2010). Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology/ Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology, 37(12), 1271-1287. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0884-5>
- Sun, J., Guo, L., Zang, W., Ping, W., & Chi, D. (2008). Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. Science in China Series C: Life Sciences, 51(8), 751-759.
- Sun, S. Y., & Xu, Y. (2008). Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. Process Biochemistry, 43(2), 219-224.
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., & Frąc, M. (2021). Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. Agriculture, 11(6), 540.
- Takó M, Kotogán A, Németh B, Radulov I, Nişî LD, Tărbu D, Dicu D, Tóth B, Papp T, Vágvölgyi C (2012) Extracellular lipase production of Zygomycetes fungi isolated from soil. Rev Agric Rural Dev 1(1):62–66
- Tedersoo, L., Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas,

- M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., . . . Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Terhonen, E., Blumenstein, K., Kovalchuk, A., & Asiegbu, F. O. (2019). Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests*, 10(1), 42.
 - Thatcher, L. F., Williams, A. H., Garg, G., Buck, S. A. G., & Singh, K. B. (2016). Transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* during colonisation of resistant and susceptible *Medicago truncatula* hosts identifies differential pathogenicity profiles and novel candidate effectors. *BMC genomics*, 17, 1-19.
 - Thomma, B. P. (2003). *Alternaria spp.*: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular plant pathology*, 4(4), 225-236.
 - Toghueo, R. M. K. (2020). Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. *Mycology*, 11(1), 1-21.
 - Trabelsi, D., & Mhamdi, R. (2013). Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. *BioMed Research International*, 2013, 1–11. doi:10.1155/2013/863240
 - Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, & Oliveira JV (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* 3(2):182–196. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
 - Tresner, H. D., & Hayes, J. A. (1971). Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*, 22(2), 210-213.
 - Valdés, G., Mendonça, R. T., and Aggelis, G. (2020). Lignocellulosic biomass as a substrate for oleaginous microorganisms: a review. *Appl. Sci.* 10:7698. doi:10.3390/app10217698
 - Van Wyk, M., Roux, J., Barnes, I., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2006). Molecular phylogeny of the *Ceratocystis moniliformis* complex and description of *C. tribiliformis* sp. nov. *Fungal Diversity*, 21, 181-201.
 - Vandenkoornhuyse, P., Husband, R., Daniell, T. J., Watson, I. J., Duck, J. M., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11(8), 1555-1564.
 - Vaquero, M. E., Barriuso, J., Martínez, M. J., & Prieto, A. (2016). Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2047-2061.
 - Veloso, J. F. C. A., & Díaz, J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathology*, 61(2), 281-288.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
- Volford B, Varga M, Szekeres A, Kotogán A, Nagy G, Vágvölgyi C, Papp T, Takó M (2021) β -galactosidase-producing isolates in mucoromycota: screening, enzyme production, and applications for functional oligosaccharide synthesis. *J Fungi* 7(3):229. <https://doi.org/10.3390/jof7030229>
- Wagner L, Stielow B, Hoffman K, Petkovits T, Papp T, Vágvölgy C, de Hoog GS, Verkley G, & Viogt K (2013) A comprehensive molecular phylogeny of the *Mortierellales* (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia: Mol Phylogeny Evol Fungi* 30(1):77–93. <https://doi.org/10.3767/003158513X666268>
- Wajs-Bonikowska, A., Smeds, A., & Willför, S. (2016). Chemical composition and content of lipophilic seed extractives of some *Abies* and *Picea* species. *Chemistry & Biodiversity*, 13(9), 1194-1201.
- Walther G, Pawłowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodriguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A, & De Hoog GS (2013). DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Pers Mol Phylogeny Evol Fungi* 30(1):11–47. <https://doi.org/10.3767/003158513X665070>
- Wang D, Xu Y, & Shan T (2008) Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochem Eng J* 41(1):30–37. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.03.003>
- Wang, Y. N., Liu, X. Y., & Zheng, R. Y. (2014) *Umbelopsis changbaiensis* sp. nov. from China and the typification of *Mortierella vinacea*. *Mycol Prog* 13(3):657–669. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0948-9>
- Wang, Y. N., Liu, X. Y., & Zheng, R. Y. (2015) *Umbelopsis longicollis* comb. nov. and the synonymy of *U. roseonana* and *U. versiformis* with *U. nana*. *Mycologia* 107(5):1023–1032. <https://doi.org/10.3852/14-339>
- Wang, L., Qin, D., Zhang, K., Huangm Q., Liu, S., Han, M. J., & Dong, J. Y. (2017) Metabolites from the co-culture of nigranoic acid and *Umbelopsis dimorpha* SWUKD3. 1410, an endophytic fungus from *Kadsura angustifolia*. *Nat Prod Res* 31(12):1414–1421. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1255891>
- Wang, Y. N., Liu, X. Y., & Zheng, R. Y. (2022). The *Umbelopsis ramanniana* sensu lato consists of five cryptic species. *Journal of Fungi*, 8(9), 895.
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 2955-2965.
- Weete, J. D. (2012). *Lipid biochemistry of fungi and other organisms*. Springer Science & Business Media.

- Weinstein, R. N., Montiel, P. O., & Johnstone, K. (2000) Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. *Mycologia* 92(2):222–229. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061148>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En T. J. White, T. Bruns, S. J. W. T. Lee, J. Taylor, M. A. Innis, D. H. Gelfand, & J. J. Sninsky (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Whiting, E. C., & Rizzo, D. M. (1999). Effect of water potential on radial colony growth of *Armillaria mellea* and *A. gallica* isolates in culture. *Mycologia*, 91(4), 627-635.
- Wingfield, M. J., Seifert, K. A., & Webber, J. F. (Eds.). (1993). *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity (pp. ix+-293).
- Wingfield, M. J., Barnes, I., de Beer, Z. W., Roux, J., Wingfield, B. D., & Taerum, S. J. (2017). Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects and tree hosts: current status—future prospects. *Biological Invasions*, 19, 3215-3228.
- Xu, J., Yang, X., & Lin, Q. (2014). Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. *Fungal Diversity*, 66(1), 37–68. doi:10.1007/s13225-014-0288-3
- Yagodnik, C. (1997). Detección, cuantificación y caracterización de la actividad proteolítica de los hongos manchadores de la madera (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Yohalem, D. S., Nielsen, K., Green, H., & Funck Jensen, D. (2004). Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. *FEMS microbiology ecology*, 47(3), 297-303.
- Yu, J. B., Bai, M., Wang, C., Wu, H., & Liang, X. (2024). Regulation of secondary metabolites accumulation in medicinal plants by rhizospheric and endophytic microorganisms. *Medicinal Plant Biology*, 3(1).
- Zhang N, Suen WC, Windsor W, Xiao L, Madison V, & Zaks A. (2003). Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Prot Eng* ;16:599–605.
- Zhao, H., Lv, M., Liu, Z., Zhang, M., Wang, Y., Ju, X., ... & Liu, X. (2021). High-yield oleaginous fungi and high-value microbial lipid resources from Mucoromycota. *BioEnergy Research*, 14, 1196-1206.
- Zheng, Y., Yu, X., Zeng, J., & Chen, S. (2012) Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnol Biofuels* 5(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-50>

- Zheng, L., Zhao, J., Liang, X., Zhan, G., Jiang, S., & Kang, Z. (2017). Identification of a Novel *Alternaria alternata* Strain Able to Hyperparasitize *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the Causal Agent of Wheat Stripe Rust. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00071
- Zhou, X. R., Dai, L., Xu, G. F., & Wang, H. S. (2021). A strain of *Phoma* species improves drought tolerance of *Pinus tabulaeformis*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87105-1>