

**Colonización de *Lolium perenne* y *Polypogon australis* por hongos endófitos  
obtenidos de Poáceas provenientes de un relave minero de Puerto Cristal, Chile**

Parada, Rodolfo; Barros, Daniel; Cotoras, Milena; Ortiz, Claudia

[rodolfo.paradaf@usach.cl](mailto:rodolfo.paradaf@usach.cl); [daniel.barros@usach.cl](mailto:daniel.barros@usach.cl); [claudia.ortiz@usach.cl](mailto:claudia.ortiz@usach.cl);  
[milena.cotoras@usach.cl](mailto:milena.cotoras@usach.cl)

Facultad de Química y Biología

Universidad de Santiago de Chile

**Resumen**

Los hongos endófitos son un grupo polifilético de organismos que poseen la capacidad de colonizar tejidos vegetales sin causar síntomas aparentes de enfermedad y se ha demostrado que mejoran el crecimiento de las plantas sometidas a condiciones desfavorables ya sea por factores bióticos como abióticos. En nuestro laboratorio se aisló y cultivó exitosamente tres hongos endófitos provenientes de las plantas identificadas como *Poa stueckertii* y *P. pratensis*. Estas plantas se desarrollan espontáneamente en un relave de una empresa de extracción y refinamiento de minerales de Pb y Zn. Para identificar los hongos endófitos, estos fueron cultivados para visualizar la morfología de las hifas aéreas. Además, se realizaron extracciones de DNA para amplificar la región que codifica para el RNA ribosomal utilizando los marcadores fúngicos ITS1 e ITS4. Al secuenciar los productos de amplificación y realizar un dendrograma con los resultados con mayor puntaje en BLAST, se lograron identificar los hongos endófitos hasta el nivel de género, los cuales corresponden a *Microdochium sp.*, *Sarocladium sp.* y *Bjerkandera sp.* Pensando en una proyección biotecnológica en el uso de estos hongos en fitorremediación bioasistida, se inocularon plantas de *Lolium perenne* y *Polypogon australis*, lográndose la colonización exitosa con el hongo *Microdochium sp.* en ambas plantas. La colonización se evaluó utilizando la amplificación los marcadores moleculares ITS y a través del cultivo de tejidos vegetales inoculados.

**Palabras clave:** relave, Poáceas, endófito, identificación

## Introducción

Los mecanismos de adaptación que poseen las plantas para tolerar altas concentraciones de metales pesados son variados (Ovecka y Takac 2014; Rascio y Navari-Izzo 2011; Yadav 2010; Visioli y Marmiroli 2013; Krämer 2010; Hanikenne y Nouet 2011). Diversos trabajos se enfocan en desarrollar estrategias para encontrar vías de señalización (Mithöfer et al. 2004), metabolitos (Michalak 2006; Yadav 2010), proteínas (Sunitha et al. 2012), microRNAs (Shriram et al. 2016; Gupta et al. 2014) y factores de transcripción asociados a la tolerancia a metales debido a sus potenciales usos en fitorremediación.

Adicionalmente a todos los sistemas intrínsecos de tolerancia a metales pesados presentes en plantas, existen otros mecanismos reportados, que se generan por efectos de la asociación de plantas con hongos y/o bacterias, a niveles rizosféricos y endófitos (Zhang et al. 2008; Li et al. 2011; Ma et al. 2016; Miransari 2011; Hildebrandt et al. 2007; Li et al. 2012; Deng y Cao 2017). Los ejemplos de la interacción de plantas con hongos endófitos y cambios en la tolerancia a metales pesados, se han descrito en especies de plantas de la familia *Poaceae*.

El término endófito incluye a todos los organismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas de

enfermedad (Carroll 1988). Los hongos endófitos pueden ser mutualistas, saprófitos y/o patógenos latentes (Rodríguez et al. 2009; Carroll 1988). Se sabe que la diversidad de hongos endófitos presentes en hojas, tallos o raíces puede variar considerablemente, tanto en términos cualitativos como cuantitativos (Bayman et al. 1997).

De la misma forma en que la comprensión del rol de las micorrizas revolucionó la agricultura orgánica, ofreciendo una alternativa natural para mejorar la asimilación de minerales, ayudar con el control biológico y aumentar la tolerancia a condiciones asociadas a estrés, los hongos endófitos pueden generar conocimientos que permitan una posible aplicabilidad tecnológica en ámbitos como la fitorremediación asistida. Con este enfoque, se han aislado hongos endófitos resistentes a diversos metales pesados, entre las especies identificadas, hay representantes de los géneros *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Phoma*, *Alternaria*, *Peyronellaea*, *Steganosporium*, *Aspergillus*, *Lasiodiplodia*, *Neotyphodium*, *Piriformospora* y *Exophiala* (Deng et al. 2014; Li et al. 2011; Li et al. 2012; Monnet et al. 2001; Karimi et al. 2011; Zhang et al. 2008).

Los mecanismos por los cuales los hongos endófitos mejoran la tolerancia a metales pesados en plantas colonizadas son aún desconocidos, ya que es

complejo estudiar al sistema en conjunto, por lo que las primeras aproximaciones a respuestas están asociadas a los fenómenos generales de tolerancia observados en *L. perenne*, *H. vulgare* y *Z. mays* colonizados con hongos endófitos, limitándose a describir la formación de biomasa y acumulación de elementos en función de la concentración del elemento metálico estresante. Estos trabajos no entregan detalles de las moléculas efectoras involucradas en los cambios de tolerancia, ni tratan de explicar los mecanismos responsables. (Monnet et al. 2001; Karimi et al. 2015; Li et al. 2011).

Lo más cercano a un mecanismo se puede encontrar en los trabajos de Shen et al. (2015) y Zhao et al. (2015) en el que atribuyen gran importancia a las enzimas glutatión S-transferasa. Pero no es novedad que los sistemas antioxidantes juegan un rol principal en la detoxificación. Además, los resultados obtenidos no son muy distintos a los descritos en *S. cerevisiae* como hongo susceptible expuesto a otros metales pesados como As, Sb, Hg, Cr, Se, Cd y Pb. (Wysocki y Tamás 2010). Esto sugiere que los mecanismos de tolerancia a metales pesados entre hongos susceptibles y tolerantes serían similares al menos en términos cualitativos, por lo que la tolerancia de *E. pisciphiala* o cualquier otro hongo debería ser evaluada de términos cuantitativos, y si se espera comprender los mecanismos de tolerancia

en una planta colonizada por un hongo endófito, se debe trabajar con el hongo desarrollándose en forma endófito, a pesar de los problemas técnicos asociados a trabajar con el sistema completo.

Con la finalidad de contribuir en el desarrollo del estudio de hongos endófitos y su rol en posibles proyecciones biotecnológicas, se propone el aislamiento y cultivo e inoculación de plantas con hongos endófitos interesantes. Las ubicaciones más propicias para encontrar hongos endófitos tolerantes a metales pesados corresponden a sitios en los cuales hay altas concentraciones de metales pesados (Tong et al. 2017). Teniendo esto en consideración, en trabajos previos realizados en el laboratorio bioquímica vegetal y fitorremediación, en el marco del proyecto Fondef ID14I10151, para la purificación de hongos endófitos se utilizaron muestras vegetales provenientes de Puerto Cristal (ubicado en la ribera norte del Lago General Carrera, Región de Aysén). En el sitio se encontraron plantas creciendo espontáneamente sobre una zona de extracción y refinación de minerales de Pb y Zn. Las especies de plantas identificadas correspondían a dos miembros de la familia *Poaceae*, *Poa pratensis* y *Poa stuckertii*. A partir de estas muestras vegetales se aislaron tres hongos endófitos.

Dado el origen de las muestras y los antecedentes mostrados, en este proyecto se espera aislar hongos endófitos y evaluar la colonización de plantas inoculados con estos hongos.

## Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es colonizar plantas de *Lolium perenne* y *Polypogon australis* con los hongos endófitos aislados de las plantas que colonizaron un relave de Puerto Cristal.

Los objetivos específicos establecidos fueron: identificar los hongos endófitos aislados y colonizar plantas de *P. australis* y *L. perenne* con los hongos aislados.

## Materiales y Métodos

El muestreo se realizó en enero del 2016 en el relave abandonado de Puerto Cristal, en la región de Aysén, Chile (46°33'30"S 72°23'20"W). Se recolectó material vegetal de tres plantas en dos diferentes localizaciones, las cuales fueron almacenadas en bolsas a 4°C hasta su procesamiento.

La esterilización de tejido se realizó como en Narayan et al., 2006. El tejido vegetal fue lavado con Tween20 0,1%, posteriormente se lavó con hipoclorito de sodio al 5% por 2 minutos, luego se realizó un enjuague dos veces con agua destilada estéril por 2 minutos. Finalmente se realizó un lavado con agua destilada estéril. El tejido fue cortado en pequeños

trozos de 0,5 cm y éstos fueron sembrados en placas de medio de extracto de malta y levadura con agar suplementado con Kanamicina 50 µg/mL. Las placas inoculadas se incubaron a 22°C por 4 semanas hasta observarse desarrollo de micelios desde el tejido desinfectado. Luego, parte del micelio se subcultivó 2 veces hasta y se realizaron cultivos monoconidiales.

Para obtención de cultivos axénicos de los hongos endófitos, se realizaron cultivos monoconidiales, para ello se cultivaron los hongos en placas con medio compuesto por agar, extracto de malta y levadura, luego en condiciones de esterilidad se colocaron 2 mL de agua glicerada (15% glicerol), sobre los hongos esporulados, y se recolectaron las suspensiones obtenidas. A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon en medio nutritivo para obtener colonias provenientes de un conidio, en un periodo de 3 a 5 días (Seymour et al 2004).

Una vez establecido el cultivo axénico, se procedió a observar algunas características morfológicas de las hifas aéreas y conidióforos generados en los microcultivos de los hongos endófitos. Para la realización de los microcultivos, se utilizó el protocolo descrito por Johnson (1946).

El análisis morfológico de los hongos se complementó con un análisis bioinformático de las secuencias amplificadas del espaciador interno de la transcripción fúngico (ITS) (Gao et al., 2014). Los partidores utilizados fueron ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Gao et al., 2014).

La extracción de DNA de las muestras se realizó mediante la utilización del PowerSoil® DNA Isolation Kit - Mo Bio.

El DNA obtenido se diluyó para que todas las muestras tengan la misma concentración de DNA (5ng/uL), la cuantificación y pureza del DNA se determinó utilizando la placa TAKE3 en un equipo Epoch™ Microplate Spectrophotometer. La reacción de amplificación del marcador ITS, se realizó utilizando el GoTaq® Green Master mix con los primers, y se enviaron dos muestras de cada producto a Macrogen para su secuenciación desde ambas hebras complementarias.

La edición de las secuencias obtenidas, el alineamiento y la elaboración de los dendrogramas se realizaron con el software GeneusR10, utilizando el algoritmo ClustalW para el alineamiento, en los parámetros de cálculo del software, se utilizaron los que estaban por defecto (costo para abrir gap de 15 y de extensión de Gap de 6,66). Luego, con los alineamientos se realizaron dendrogramas

utilizando el modelo de distancia genética de Tamura-Nei y el método de construcción del árbol de Neighbor-Joining. El número de secuencias utilizadas y los grupos externos se detallan en cada dendrograma, el remuestreo para cada dendrograma fue de 1000 *bootstrap* y el *support threshold* de 50%.

La inoculación de las plantas se realizó en condiciones de esterilidad, embebiendo las semillas desinfectadas en una suspensión de conidios ( $10^2$  conidios/mL) y cultivando estas plantas en un sistema cerrado y estéril durante 2 semanas.

La evaluación de la colonización fue realizada por PCR y secuenciación de los marcadores moleculares, utilizando el DNA extraído de plantas inoculadas y desinfectadas superficialmente como se describió anteriormente. También se evaluó la colonización mediante el cultivo de estos tejidos.

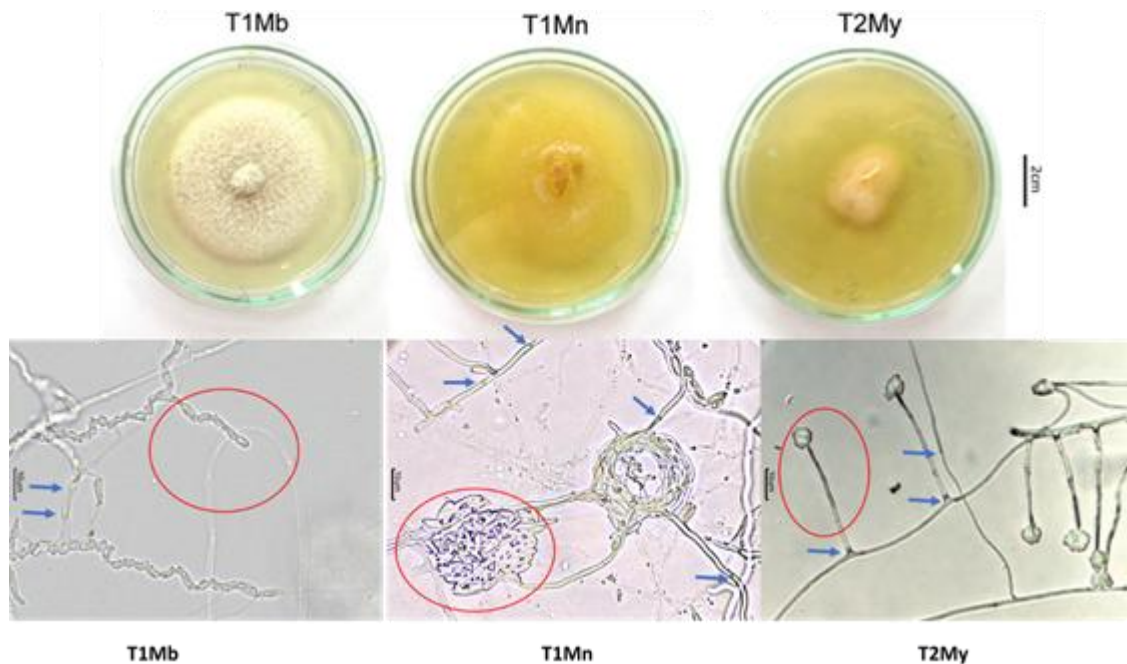
## Resultados y Discusión

A partir de las muestras vegetales se pudieron aislar tres hongos endófitos. Los hongos endófitos aislados de *Poa stuckertii* fueron llamados inicialmente T1Mn y T1Mb fueron y el hongo aislado de *Poa pratensis* se denominó T2My. Para la identificación de los hongos se analizó la morfología de las hifas aéreas en microcultivo. En la Figura 1 se muestran placas cultivadas con los tres hongos

endófitos, también se muestran imágenes de las hifas aéreas obtenidas a partir de los hongos en microcultivo.

Los tres hongos filamentosos poseen septos característicos de hongos del subreino Dicariomycota (marcados con

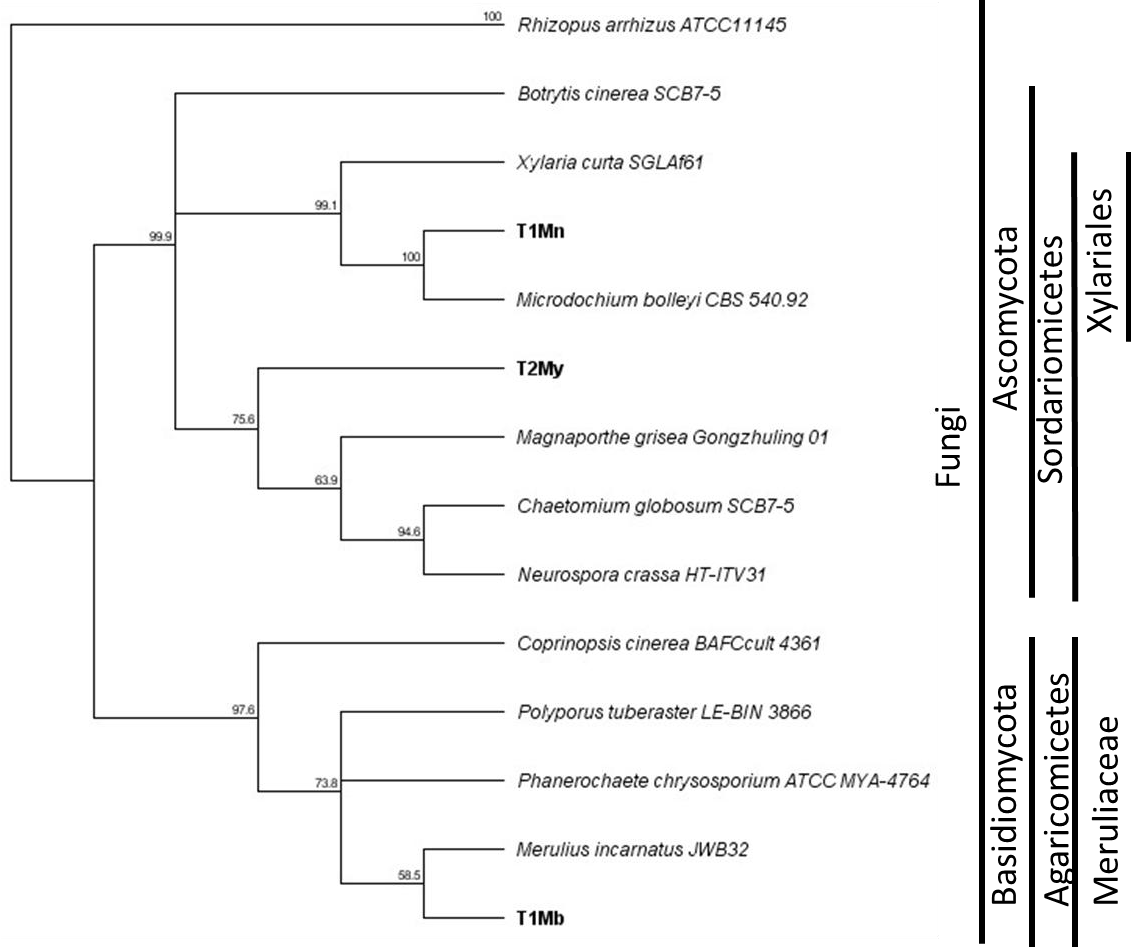
flechas azules). Los tres hongos poseen estructuras de reproducción asexual, en el caso de T1Mb estas corresponden a artrosporas y en T1Mn y T2My se observaron conidios (destacados con círculos rojos).



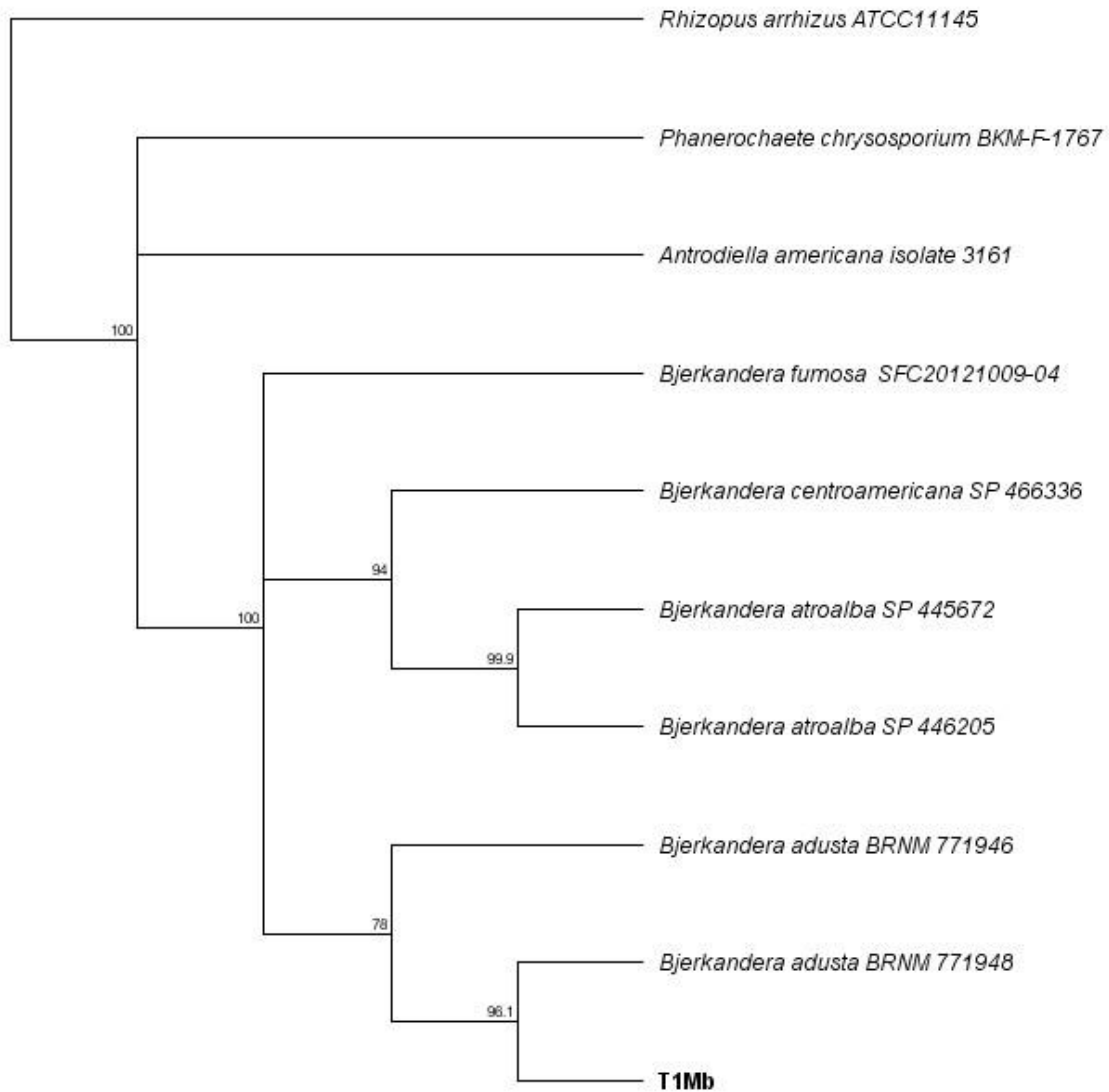
**Figura 1:** Morfología del cultivo de los hongos endófitos aislados en medio con agar extracto de malta y levadura (superior) e imágenes de sus correspondientes hifas aéreas formadas en microcultivo (inferior). Se destacan con flechas azules los septos, y en rojo estructuras de reproducción asexual, conidios (T1Mn y T2My), y artrosporas (T1Mb).

Para complementar los resultados obtenidos del análisis morfológico y llegar a una asignación taxonómica más detallada, se procedió analizar las secuencias ITS de los hongos cultivados. El dendrograma obtenido al comparar las secuencias ITS de los tres hongos con otros 11 representantes del reino Fungi se muestra en la Figura 2. Los resultados mostrados en la Figura 2 sugieren que el hongo T1Mb corresponde a un hongo del

filo Basidiomycota. Para corroborar la información, se realizaron Dendrogramas utilizando las secuencias ITS de diversos representantes de este filo hasta llegar las especies más cercana a la secuencia de obtenida, que corresponde a las provenientes de especies del género *Bjerkandera*. Al realizar el dendrograma correspondiente (Figura 3) se observa que T1Mb se agrupa en un clade con *Bjerkandera adusta*.



**Figura 2:** Dendrograma obtenido a partir del análisis de las secuencias amplificadas del marcador ITS de los hongos endófitos obtenidos (en negrita) y secuencias ITS de otros 11 hongos, para el alineamiento se utilizó el algoritmo de ClustalW. El agrupamiento de las muestras se realizó utilizando el método de Neighbor-Joining con el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (*Rhizopus arrhizus* ATCC11145 como *outgroup*) con un remuestreo de 1000 (*bootstrap*) en colores se indica la asignación taxonómica hasta nivel de orden de los clades que contienen a las muestras analizadas



**Figura 3:** Dendrograma obtenido a partir del análisis de las secuencias amplificadas del marcador ITS del hongo endófito T1Mb (en negrita) y secuencias ITS de otros 9 hongos, para el alineamiento se utilizó el algoritmo de ClustalW. El agrupamiento de las muestras se realizó utilizando el método de Neighbor-Joining con el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (*Rhizopus arrhizus* ATCC11145 como *outgroup*) con un remuestreo de 1000 (*bootstrap*).

En el caso del hongo T1Mn, el dendrograma fue realizado de manera similar al anterior (Figura 4). Los resultados obtenidos agruparon en un mismo clado a la secuencia de T1Mn y la de *Microdochium bolleyi*. Al reevaluar las imágenes obtenidas del microcultivo de T1Mn se confirmó la presencia de células conidiogénicas características de hongos

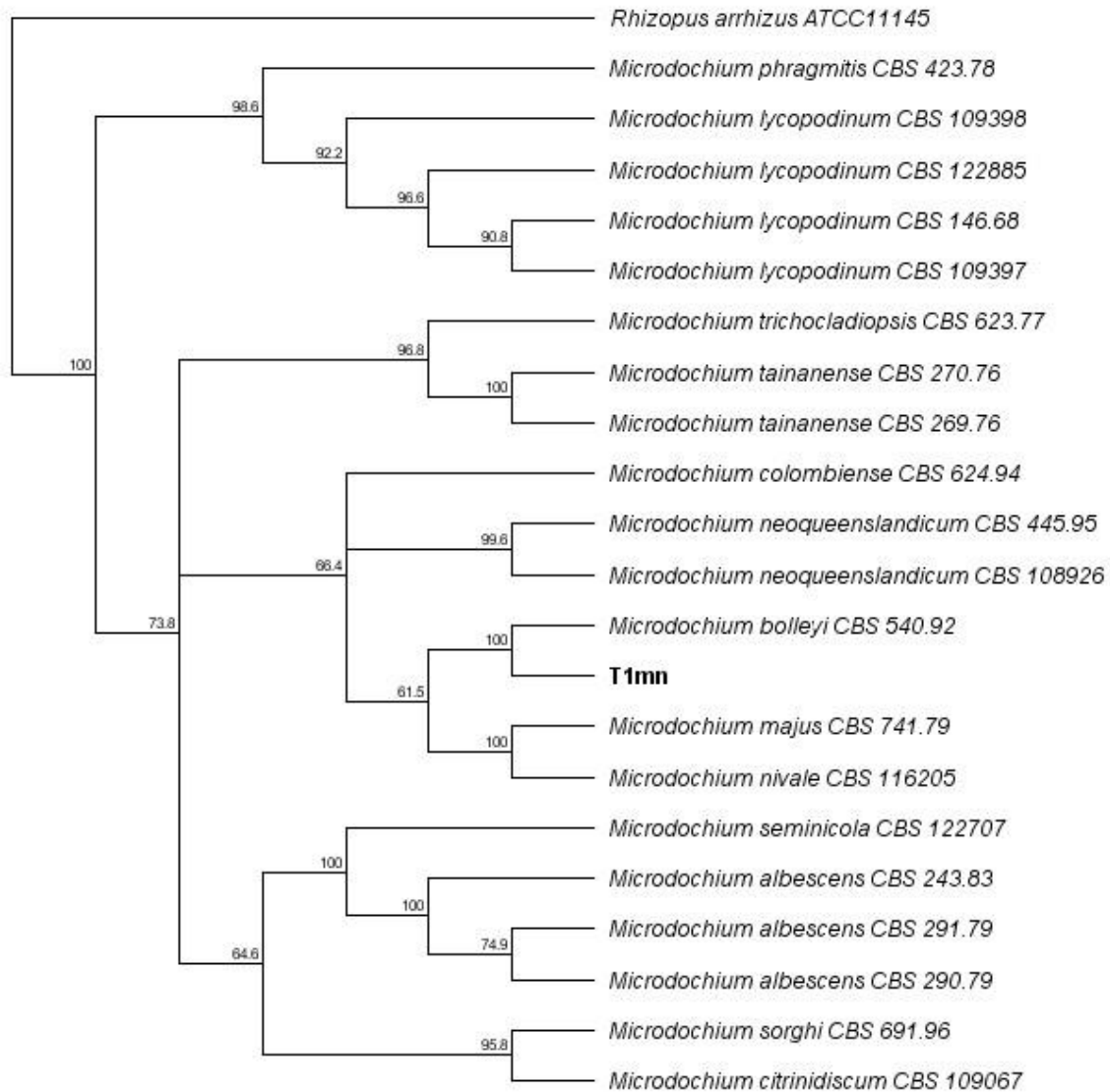
del género *Microdochium*, y el aspecto de la colonia es similar al reportado para las especies del género descritas en el trabajo de Hernández-Restrepo et al., 2016, quien publicó hace un par de años una revisión de la filogenia de este grupo.

Al trabajar con las secuencias ITS relacionadas con el hongo T2My, esta fue

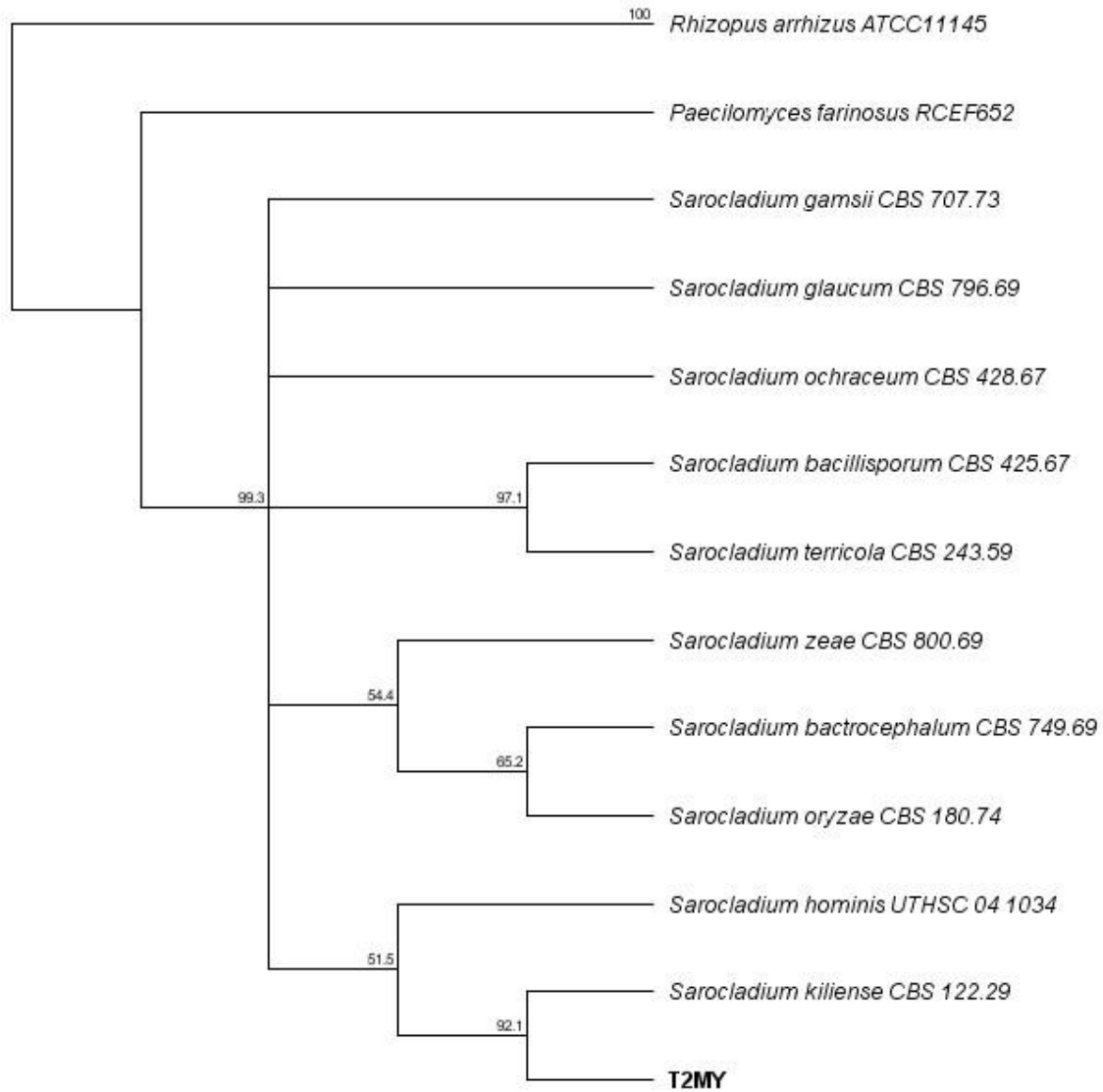


asignada en el mismo clade con las provenientes de especies del género *Sarocladium* (Figura 5). Al observar las imágenes de microcultivos de T2My, se observa la formación fíalides solitarias no

ramificadas, terminadas en una agrupación de conidios unicelulares fusiformes contenidos en una estructura esférica mucoide.



**Figura 4:** Dendrograma obtenido a partir del análisis de las secuencias amplificadas del marcador ITS del hongo endófito T1Mn (en negrita) y secuencias ITS de otros 21 hongos, para el alineamiento se utilizó el algoritmo de ClustalW. El agrupamiento de las muestras se realizó utilizando el método de Neighbor-Joining con el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (*Rhizopus arrizus* ATCC11145 como *outgroup*) con un remuestreo de 1000 (*bootstrap*).



**Figura 6:** Dendrograma obtenido a partir del análisis de las secuencias amplificadas del marcador ITS del hongo endófito T2My (en negrita) y secuencias ITS de otros 12 hongos, para el alineamiento se utilizó el algoritmo de ClustalW. El agrupamiento de las muestras se realizó utilizando el método de Neighbor-Joining con el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (*Rhizopus arrizus* ATCC11145 como *outgroup*) con un remuestreo de 1000 (*bootstrap*).

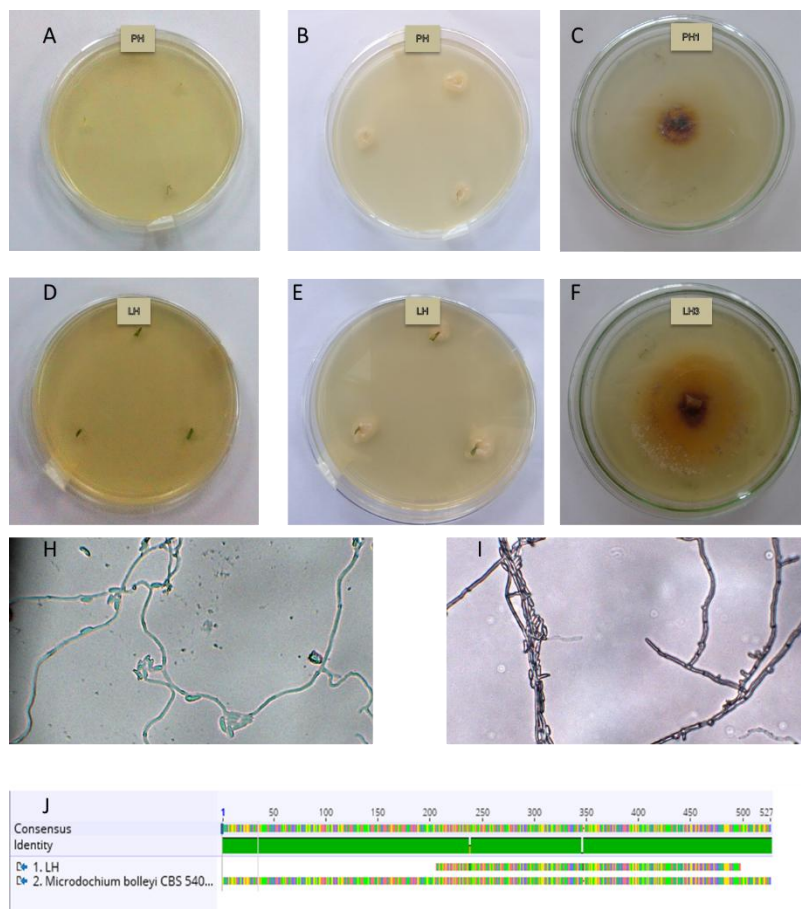
Cabe destacar que *Sarocladium* era sinónimo de *Acremonium*, y poseen esta característica estructural, pero este último corresponde a un grupo polifilético con representantes de varios órdenes distintos dentro del filo Ascomycota (Summerbell et al., 2011). Los *Acremonium* que actualmente se reconocen como

*Sarocladium*, son representantes monofiléticos del orden *Hypocreales*, y entre estos destacan algunas especies dermatófitas, fitopatógenas y endófitas (Giraldo et al., 2015).

Una vez identificadas las especies de hongos endófitos aislados, se procedió a

inocular semillas desinfectadas de las poaceas *Lolium perenne* y *Polypogon australis*. Los resultados de la colonización tras dos semanas de cultivos se evaluaron a partir del análisis de las secuencias obtenidas de la amplificación de los marcadores moleculares ITS utilizando DNA total extraído a partir de plantas inoculadas. También se evaluó el éxito de la colonización a partir del cultivo de tejidos vegetales inoculados y

posteriormente desinfectados. Parte de los resultados obtenidos para evaluar la colonización se observa en la Figura 6, en la que se muestra la confirmación de la colonización de las dos especies de plantas inoculadas con el hongo endófito *Microdochium sp.* La colonización por hongos endófitos en especies de plantas distintas del hospedero original ha sido documentada (Li et al., 2011).



**Figura 6:** Evaluación de la colonización de *L. perenne* y *P. australis* con el hongo endófito *Microdochium sp.* Cultivadas en condiciones de esterilidad durante 0 (A, D) y 2 semanas (B, E) y desinfectadas superficialmente puesto sobre medio PDA. C, F) Subcultivo de los hongos que crecieron a partir de A y D. H, I) imágenes en microscopia óptica de B y E. G alineamiento de las secuencias de el marcador ITS de *Microdochium bolleyi* y la secuencia amplificada a partir de una muestra de DNA de F.

Los resultados de la evaluación de colonización de las plantas se realizó inoculando 3 segmentos de hojas y raíces de 3 plantas de cada especie, y fueron desinfectadas superficialmente, luego se evaluó el crecimiento del hongo endófito en las plantas inoculadas y exitosamente colonizadas

Los resultados mostrados en la tabla I, muestra que hubo una colonización exitosa en hojas de ambas especies de plantas inoculadas con al menos una

especie fúngica, pero en el caso de los otros dos hongos, los resultados no indican una colonización exitosa en las condiciones y tiempos utilizados en los ensayos de colonización

**Tabla I:** evaluación de la colonización de *P.australis* y *L.perenne* con los hongos endófitos aislados

Hongo endófito / Planta	Confirmación por cultivo		Confirmación por PCR
	Hojas / Raíz		
<i>Bjerkandera sp.</i> <i>L. perenne</i>	11.0±19.1 / 0.0±0.0		Negativa
	0.0±0.0 / 0.0±0.0		Negativa
<i>Microdochium sp.</i> <i>L. perenne</i>	100±0.0 / 11.0±19.1		Positiva
	88.7±19.6 / 0.0±0.0		Positiva
<i>Sarocladium sp.</i> <i>L. perenne</i>	22.0±38.1 / 0.0±0.0		Negativa
	22.0±19.1 / 0.0±0.0		Negativa

### Conclusiones

Se identificaron los tres hongos endófitos aislados a partir de las muestras vegetales provenientes de un relave en Puerto Cristal. La estrategia utilizada para inocular plantas de la familia *Poaceae* distintas a las de donde originalmente se aislaron los hongos, mostró resultados positivos de colonización en tejido epigeo

de ambas plantas inoculadas con uno de los tres hongos endófitos.

### Bibliografía

Bayman, Paul, Ligia L. Lebron, Raymond L. Tremblay, y D. Jean Lodge. 1997. "Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae)". *New Phytologist*

- 135(1): 143–49.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1), 2-9.
- DalCorso, Giovanni, Anna Manara, y Antonella Furini. 2013. "An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots." *Metallomics* 5(9): 1117.
- Deng, Z., & Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review. *Chemosphere*, 168, 1100-1106.
- Deng, Zujun et al. 2014. "Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasioidiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils". *Environmental Science and Pollution Research* 21(3): 2346–57.
- Gao, L., Zhang, M., Zhao, W., Hao, L., Chen, H., Zhang, R., ... & Sun, G. (2014). Molecular and morphological analysis reveals five new species of *Zygothia* associated with flyspeck signs on plant hosts from China. *PLoS one*, 9(10), e110717.
- Giraldo, A., Gené, J., Sutton, D. A., Madrid, H., De Hoog, G. S., Cano, J., ... & Guarro, J. (2015). Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 10.
- Gupta, D. K., H. G. Huang, y F. J. Corpas. 2013. "Lead tolerance in plants: Strategies for phytoremediation". *Environmental Science and Pollution Research* 20(4): 2150–61.
- Gupta, O. P., P. Sharma, R. K. Gupta, y I. Sharma. 2014. "MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: Present status and future perspectives". *Plant Molecular Biology* 84(1-2): 1–18.
- Halušková, L. et al. 2009. "Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips". *Plant Physiology and Biochemistry* 47(11-12): 1069–74.
- Hanikenne, Marc, y Cécile Nouet. 2011. "Metal hyperaccumulation and hypertolerance: A model for plant evolutionary genomics". *Current Opinion in Plant Biology* 14(3): 252–59.
- Hernández-Restrepo, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2016). Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of*

*Fungi*, 36, 57

Hildebrandt, Ulrich, Marjana Regvar, y Hermann Bothe. 2007. "Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance". *Phytochemistry* 68(1): 139–46.

Johnson, E. A. (1946). An Improved Slide Culture Technique for the Study and Identification of Pathogenic Fungi. *Journal of Bacteriology*, 51(6), 689–694.

Karimi, F, M Sepehri, M Afuni, y M A Hajabbasi. 2015. "Effect of Endophytic Fungus , Piriformospora Indica , on Barley Resistance to Lead". 19(71): 2015.

Karimi, Fatemeh, Mozhgan Sepehri, Majid Afyuni, y M A Hajabbasi. 2011. "Role of Piriformospora indica in barley ( *Hordeum vulgare* L.) resistance to cadmium, lead and copper". En Rhodes, Greece: Proceedings of the 12 th International Conference on Environmental Science and Technology, 8–10.

Krämer, Ute. 2010. "Metal hyperaccumulation in plants." *Annual review of plant biology* 61: 517–34.

Kuldau, G., y C. Bacon. 2008. "Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses".

*Biological Control* 46(1): 57–71.

Li, Hai Yan, Da Qiao Wei, Mi Shen, y Zuo Ping Zhou. 2012. "Endophytes and their role in phytoremediation". *Fungal Diversity* 54(1): 11–18.

Li, Hai-yan et al. 2011. "Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb e Zn mine wasteland in China". *Fungal Ecology* 5(3): 309–15.

Li, T. et al. 2011. "Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*". *Science of the Total Environment* 409(6): 1069–74.

Ma, Ying, Mani Rajkumar, Chang Zhang, y Helena Freitas. 2016. "Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation". *Journal of Environmental Management* 174: 14–25.

Michalak, a. 2006. "Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress". *Plant Cell* 15(4): 523–30.

Miransari, Mohammad. 2011. "Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals". *Biotechnology Advances* 29(6): 645–53.

Mithöfer, Axel, Birgit Schulze, y Wilhelm

- Boland. 2004. "Biotic and heavy metal stress response in plants: Evidence for common signals". *FEBS Letters* 566(1-3): 1–5.
- Monnet, Fabien et al. 2001. "Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*". *Physiologia Plantarum* 113(4): 557–63.
- Narayan Chandra Paul, Won Ki Kim, Sung Kyoon Woo, Myung Soo Park & Seung Hun Yu (2006) Diversity of Endophytic Fungi Associated with *Taraxacum coreanum* and Their Antifungal Activity, *Mycobiology*, 34:4, 185-190
- Ouziad, Fouad, Ulrich Hildebrandt, Elmon Schmelzer, y Hermann Bothe. 2005. "Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress". *Journal of Plant Physiology* 162(6): 634–49.
- Ovecka, M., y T. Takac. 2014. "Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools". *Biotechnology Advances* 32(1): 73–86.
- Rascio, Nicoletta, y Flavia Navari-Izzo. 2011. "Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?" *Plant Science* 180(2): 169–81.
- Rodriguez, R J, J F White, a E Arnold, y R S Redman. 2009. "Fungal endophytes: diversity and functional roles." *The New phytologist* 182(2): 314–30.
- Shen, Mi et al. 2015. "Identification of glutathione S-transferase (GST) genes from a dark septate endophytic fungus (*Exophiala pisciphila*) and their expression patterns under varied metals stress". *PLoS ONE* 10(4): 1–13.
- Shriram, Varsha et al. 2016. "MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants". *Frontiers in Plant Science* 7(June): 1–18.
- Singh, Samiksha et al. 2015. "Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics and ionomics". *Frontiers in Plant Science* 6(February): 1–36.
- Summerbell, R. C., Gueidan, C., Schroers, H. J., De Hoog, G. S., Starink, M., Rosete, Y. A., ... & Scott, J. A. (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68, 139-162.
- Sunitha, M S R I Lakshmi et al. 2012.

- “Cellular and Molecular Mechanisms of Heavy Metal Tolerance in Plants : a Brief Overview of Transgenic Plants Over- Expressing Phytochelatin Synthase and Metallothionein Genes”. *Plant cell biotechnology and molecular biology* 14(1 and 2): 33–48.
- Tong, Jia et al. 2017. “Endophytic fungi and soil microbial community characteristics over different years of phytoremediation in a copper tailings dam of Shanxi, China”. *Science of The Total Environment* 574: 881–88. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716320915>.
- Visioli, Giovanna, y Nelson Marmioli. 2013. “The proteomics of heavy metal hyperaccumulation by plants”. *Journal of Proteomics* 79: 133–45.
- Wysocki, Robert, y Markus J Tamás. 2010. “How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids.” *FEMS microbiology reviews* 34(6): 925–51.
- Yadav, S. K. 2010. “Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants”. *South African Journal of Botany* 76(2): 167–79.
- Zhang, Tao, y Yi-Feng Yao. 2015. “Endophytic Fungal Communities Associated with Vascular Plants in the High Arctic Zone Are Highly Diverse and Host-Plant Specific”. *Plos One* 10(6): e0130051.
- Zhang, Yujie et al. 2008. “Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in Vitro”. *Journal of Microbiology* 46(6): 624–32.
- Zhao, Dake et al. 2015. “Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data”. *Microbiological Research* 170: 27–35.

## Financiamiento

FONDEF IT16I10090; FONDEF-IDEA ID14I10151 ;DICYT 021743OC