

Hongos endófitos asociados a estructuras reproductivas del Guayabo Blanco (*Eugenia uruguayensis*); producción de enzimas y metabolitos bioactivos



Rafael Ruiz Luberiaga

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Hongos endófitos asociados a estructuras reproductivas del Guayabo Blanco (*Eugenia uruguayensis*); producción de enzimas y metabolitos bioactivos

Rafael Ruiz Luberiaga

Orientador: Licenciada Susana Tiscornia

Tribunal: Lic. Susana Tiscornia, Dra. Sandra Lupo,
Dra. Lina Bettucci

Octubre 2012

Agradecimientos

A la Dra. Lina Bettucci por haberme permitido realizar mi pasantía de grado en su laboratorio. Por sus correcciones y aportes efectuados en este trabajo.

A mi tutora Susana, quién siempre estuvo a mi lado, por su enseñanza, sus correcciones, sus buenas ideas, su paciencia y su dedicación.

A Sandra, por su apoyo, su enseñanza, sus correcciones y por siempre estar.

A Seba, Raquel, Eduardo y Dinorah por estar siempre también para asistirme en lo que necesité.

Y a todos los integrantes del laboratorio: Lucia, Mariela, Agustina, Anita, Natalia, Umberto, Welker, Luis, Carlos, Sebastián y Fernando, en especial a mis compañeras Belén y Silvina.

Por otra parte quiero agradecer a mis padres que me dieron la oportunidad de estudiar y sin ellos nada de esto hubiera sido posible, conteniéndome y apoyándome en todo.

También quiero agradecer a mis hermanos, y a todos mis amigos que siempre han estado, en especial a Vice, Andrés y Carlitos.

Por último quiero darte gracias a ti Noe, porque en los años que duro ésta carrera has sido mi amiga, mi apoyo y mi contención.

“...y al llegar tú estarás allí...”

Índice

	Página
1. Introducción.....	6
1.2. Endófitos: concepto y evolución del término	8
1.3. Relaciones ecológicas de los endófitos	9
1.4. Interacción y Tipos de transmisión.....	12
1.5. Enzimas fúngicas.....	15
1.6. Producción de metabolitos bioactivos	22
1.7. Utilización de Técnicas moleculares.....	25
1.8. Familia Myrtaceae	27
2. Objetivos.....	30
3. Metodología	
3.1. Muestreo	31
3.2. Procesamiento de las muestras.....	32
3.3. Identificación de los hongos aislados	
3.3.1. Identificación mediante características macromorfológicas	32
3.3.2. Identificación Molecular	33
3.4. Estudio Enzimático	
3.4.1. Celulasas.....	34
3.4.2. Pectinasas.....	34
3.4.3. Ligninasas	35
3.5. Obtención y evaluación de metabolitos bioactivos	35
3.6. Análisis de Datos.....	35
4. Resultados	
4.1. Aislamiento e identificación morfológica.....	38
4.2. Identificación molecular	54
4.3. Análisis filogenético de <i>Phomopsis</i> spp.....	56
4.4. Estudio enzimático	57
4.5. Evaluación de Metabolitos bioactivos.....	59

5. Discusión	
Aislamiento e identificación de la comunidad endofítica	61
Producción de enzimas extracelulares	64
Metabolitos bioactivos	65
6. Conclusiones y Perspectivas	68
7. Bibliografía	69
8. Anexos	
Anexo 1. Análisis Moleculares	83
Anexo 2. Medios de Cultivo empleados	85

1. Introducción

En los últimos 30 años el concepto de endófito ha aparecido con una frecuencia creciente en publicaciones científicas. Los primeros estudios referidos a hongos endófitos fueron realizados en Gramíneas a finales del 1800, mientras que los estudios en otros grupos de plantas, no comenzaron hasta la década del 70 del pasado siglo (Sánchez-Márquez, 2009). Existiendo a su vez un número reducido de publicaciones sobre la microbiota endófito asociada a estructuras reproductivas en plantas leñosas (Lupo *et al.* 2001).

El término, que proviene del siglo XIX, ha evolucionado notablemente a medida que se fueron encontrando asociaciones con distintas partes de las plantas y las modalidades de asociación con sus hospederos (Carroll, 1986; 1988). Hoy, se podría afirmar que existe algún grado de consenso en aceptar a los organismos endófitos como aquellos que viven asintóticamente dentro de tejidos vivos de las partes aéreas de las plantas (Carroll, 1986), considerándose también endófitos los que se encuentran en las raíces, excluyendo a los hongos micorrízicos (Saikkonen *et al.*, 1998). Muchos de estos hongos luego de vivir por un tiempo como simbioses neutrales, pueden llegar a causar síntomas, siempre y cuando se den las condiciones ambientales, fisiológicas y ecológicas apropiadas (Bettucci *et al.* 2004).

A la fecha, no se ha encontrado una especie vegetal en la cual no se hayan detectado hongos endófitos, es más, en algunas especies de plantas se han llegado a identificar más de cien especies endofíticas (Zabalgogezcoa, 2008). Esto representa un componente importante y cuantificable de la diversidad de los hongos, afectando además la biodiversidad y la estructura de las comunidades de plantas (Sanders, 2004; Gonthier *et al.*, 2006).

Los hongos cumplen un rol clave en lo que respecta a la re-translocación de nutrientes y al desempeño como descomponedores primarios, teniendo un papel central en la descomposición de lignina y carbohidratos poliméricos, los cuales son los componentes mayoritarios de los ecosistemas vegetales (Oses *et al.* 2006; Osono, 2006). Esto se debe a su amplia tolerancia a la acidez y a su capacidad en la producción de un alto rango de sistemas enzimáticos (Korkama-Rajala *et al.* 2008). Tres de las enzimas más destacables, involucradas en la biodegradación de tales compuestos son: celulasas, pectinasas y ligninasas.

Estos organismos además, son capaces de producir una gran variedad de metabolitos con alta actividad biológica, resultado del metabolismo secundario particularmente activo debido a la interacción hongo-hospedero. Tales compuestos son potencialmente útiles para diversos campos como la agricultura (control biológico) y la medicina (producción de antibióticos, fármacos anticancerígenos), entre otros, y representan un recurso relativamente inexplorado (Hussain *et al.* 2009; Prada *et al.*, 2009).

Existen pocas investigaciones sobre hongos endófitos en especies de plantas nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae (Bettucci *et al.* 2004)). Habiendo sido estudiados los hongos endófitos asociados a las estructuras reproductoras de géneros cultivados introducidos como *Eucalyptus* (Lupo *et al.* 2001).

1.2. Endófitos: concepto y evolución del término

Desde la aparición del concepto endófito mucho se ha escrito sobre estos organismos. Los mismos han sido definidos de muchas formas y existen a su vez incontables revisiones e incluso libros sobre dicho tema (Hyde & Soyong, 2008).

El término endófito se remonta por primera vez al año 1866, cuando Antón de Bary definió a los endófitos como aquellos organismos que colonizan los tejidos internos de las plantas (Sánchez-Márquez, 2009).

Carroll (1986) restringe el uso del término endófito a aquellos organismos causantes de infecciones asintomáticas en los tejidos de las plantas, excluyendo así, tanto a hongos patogénicos y mutualistas como a hongos micorrízicos.

En 1991, Petrini propone una expansión del término endófito propuesto por Carroll en 1986, incluyendo a todos los organismos que habitan los órganos de las plantas al menos por un tiempo en su ciclo de vida, y que pueden colonizar los tejidos de las mismas sin causar daños aparentes a sus huéspedes.

En 1992, Hirsch & Braun proponen que los hongos endofíticos son aquellos que colonizan tejidos vivos de plantas sin ocasionar ningún efecto negativo, inmediato o visible.

Bacon & White (2000), definen a los endófitos fúngicos como aquellos microorganismos que viven en asociaciones con plantas y que son comúnmente observados en la naturaleza.

Según Bárbara Schulz & Christine Boyle (2005), los hongos endófitos son aquellos capaces de colonizar los tejidos de las plantas sin causar síntomas visibles de enfermedad en algún momento específico.

La breve sucesión de definiciones representan una pequeña parte de lo que es la gran evolución del término endófito a lo largo de la literatura científica, continuando hasta nuestros días. Algo importante es que los organismos endófitos no son solamente hongos ya que también existen bacterias endófitas (Wilson, 1995), además el término podría extenderse e incluir a grupos tan dispares como protistas e invertebrados que viven dentro del cuerpo de determinados vegetales, siempre y cuando estos sean asintomáticos (Gamboa-Gaitán, 2006).

En la actualidad la mayoría de los estudios que involucran organismos endófitos están dirigidos principalmente a los endosimbiontes fúngicos (Gamboa-Gaitán, 2006).

1.3. Relaciones ecológicas de los endófitos

Se distinguen dos grandes grupos de hongos endófitos: los clavicipetaceos (grupo 1) que infectan algunos pastos y los no clavicipetaceos (grupo 2) asociados a plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas. Recientemente este último grupo se ha dividido en tres grandes grupos funcionales (Rodríguez *et al.* 2008).

Grupo de los Clavicipetaceos

Clase 1: representan un número pequeño de especies filogenéticamente relacionadas, que ocurren típicamente dentro de los tallos de plantas gramíneas donde forman enfermedades de forma sistémica con los tejidos de la planta y cuyo micelio se desarrolla en espacios intercelulares (Bischoff & White, 2005; Rodríguez *et al.* 2008). Incluyen especies libres y simbióticas asociadas con insectos, hongos, pastos, juncos y juncias (Bacon & White, 2000). La mayoría potencian la resistencia de sus huéspedes frente a la herbivoría por parte de insectos y mamíferos (Clay, 1990; White, 1987), confiriendo mecanismos que permiten tolerar distintos tipos de estrés tanto abióticos como bióticos (Arechavaleta, 1989; Malinowski & Belesky, 2000).

Presentan transmisión vertical, pasando de una generación a la siguiente a través de las semillas.

Grupo de los No-Clavicipetaceos

Clase 2: comprende una diversidad de especies que presentan baja abundancia en la rizosfera, siendo miembros todas ellas del subreino *Dikarya* (Ascomycota o Basidiomycota), con una mayor cantidad de Ascomycota pertenecientes al subphylum Pezizomycotina, y unos pocos representantes de Basidiomycota cuyos miembros pertenecen a los subphyla Agaricomycotina y Pucciniomycotina (Rodríguez *et al.* 2008). Colonizan raíces, tallos y hojas. Dicha colonización ocurre a través de estructuras de infección como apresorios o por penetración hifal de los tejidos vegetales, formando extensas infecciones. El crecimiento ocurre intercelularmente (fase dominante) pudiendo existir un bajo nivel de esporulación o formación de apresorios en tejidos sanos. La clase 2 se caracteriza por su rápida emergencia y esporulación durante la senescencia del huésped. La transmisión ocurre vía tegumentos de semillas (transmisión vertical) y/o rizomas.

Algunos de ellos incrementan la biomasa de tallos y raíces, ya sea, induciendo a la planta a la síntesis de fitohormonas o sintetizando metabolitos que imitan algunas funciones de estas (Tudzynski & Sharon, 2002). Otros confieren tolerancia a ciertos tipos de estrés tanto biótico como abiótico (Arnold *et al.* 2003).

Algo único de esta clase es la colonización asintomática, confiriendo a un rango de huéspedes genéticamente distantes adaptaciones de hábitat (incremento del *fitness*) (Rodríguez *et al.* 2008).

Clase 3: se distinguen por su ocurrencia primaria o exclusiva en tejidos aéreos, transmisión horizontal, formación de infecciones localizadas, capacidad de conferir beneficios o costos que no necesariamente son de adaptación al hábitat y por su alta biodiversidad en las plantas (Rodríguez *et al.* 2008).

Incluye a los hongos endófitos hiperdiversos asociados a hojas de árboles tropicales (Arnold *et al.* 2000), así como también aquellos asociados a plantas no vasculares, plantas vasculares sin semillas, coníferas y angiospermas tanto leñosas como herbáceas con amplios rangos de biomas (Murali *et al.* 2007). Estos además de ser encontrados en tejidos vegetativos, son encontrados en tejidos reproductivos (flor y fruto) (Barengo *et al.* 2000), siendo raramente hallados en semillas (Arnold *et al.* 2003).

Se destaca en la clase 3, la alta diversidad dentro de los tejidos vegetales, plantas y poblaciones. Por ejemplo, hojas diferentes de un mismo árbol pueden llegar a tener ensamblajes distintos de hongos endofíticos; determinadas plantas pueden albergar más de 100 especies, e incluso plantas de una misma especie pueden contener más de 1000 especies si las condiciones ambientales varían (Arnold *et al.* 2003). Esta enorme diversidad, no es exclusivamente un fenómeno tropical ya que también es observada en bosques boreales y de climas templados (Higgins *et al.* 2007).

Al igual que la clase 2, la mayoría de los miembros de la clase 3 pertenecen a los Dikarya, con una mayor concentración de Ascomycota, y dentro de estos los Pezizomycotina son los que mejor representados están, en menor grado le siguen los Saccharomycotina; dentro de los Basidiomycota encontramos miembros de Agaricomycotina, Pucciniomycotina y Ustilaginomycotina (Arnold *et al.* 2007).

Debido a la alta diversidad existente, los roles ecológicos de la clase 3 son difíciles de discernir y en la mayoría de los casos no han sido explorados aún (Rodríguez *et al.* 2008).

Clase 4: dos características bastan para considerarlos como grupo funcional: (1) presencia de septos melanizados oscuros y (2) su restricción a ser encontrados únicamente en las raíces de las plantas (Rodríguez *et al.* 2008).

Comprende primariamente hongos ascomicetos conidiales o estériles que forman estructuras melanizadas como hifas inter e intracelulares y así como también microsclerocios en raíces, y cuya transmisión es primordialmente horizontal (Jumpponen & Trappe, 1998).

Presentan poca especificidad de huésped y hábitat, no son considerados patógenos por lo que la literatura los identifica como endófitos en el sentido general (Hirsch & Braun, 1992).

Se les atribuye un rol de importancia a nivel ecofisiológico, pero poco se conoce sobre este. Esta clase representa un grupo grande e interesante de hongos que aun no están claramente definidos taxonómica y ecológicamente (Rodríguez *et al.* 2008).

El cuadro 1 muestra de manera resumida las principales características tomadas en cuenta para ubicar a los hongos endófitos en cuatro clases distintas.

Cuadro 1. Criterio utilizado para caracterizar las distintas clases de hongos endófitos. **De no adaptación al hábitat*: beneficios como tolerancias a drogas y crecimiento potenciado. *De adaptación de hábitat*: beneficios que son resultado de presiones selectivas como pH, temperatura y salinidad. Tomado y modificado de Rodríguez *et al.* 2008.

Criterio	Clavicipetaceos		No – Clavicipetaceos	
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de Hospedero	Estrecho	Amplio	Amplio	Amplio
Tejido (s) colonizados	Tallo y rizoma	Tallo, raíz y rizoma.	Tallo	Raíz
Colonización <i>in planta</i>	Extensa	Extensa	Limitada	Extensa
Biodiversidad <i>in planta</i>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
Transmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
<i>Fitness</i> – beneficio*	De no adaptación	De (y no) adaptación	De no adaptación	De no adaptación.

1.4. Interacción y Tipos de transmisión de los endófitos.

Dentro de este gran grupo de hongos existen distintos mecanismos de transmisión y estilos de vida simbiótica. Hay patógenos latentes, pero estos aparentemente representarían un subgrupo pequeño dentro de los organismos endófitos, también hay especies saprofitas latentes y mutualistas (Zabalgoeazcoa, 2008).

Los estilos de vida son el resultado de las especies fúngicas y vegetales involucradas, y el resultado de la interacción entre éstas, la cual puede variar desde antagonismo a mutualismo. Producto de esto Schulz & Boyle (2005) definen esta interacción como un continuo.

Desde su aparición, el término endófito se ha convertido en sinónimo de mutualismo, postulándose que al igual que las micorrizas, los endófitos interaccionarían mutualísticamente con las plantas hospederas. (Carroll, 1986). La planta le brinda al hongo estructura espacial, protección frente a la desecación, nutrientes y (en el caso de la existencia de transmisión vertical), diseminación hacia la siguiente generación de hospederos. El hongo le brinda a la planta, incremento en la resistencia a los herbívoros y patógenos mediante la producción de alcaloides (Leuchtman, 1992; Faeth & Fagan, 2002).

Esta última hipótesis se mantiene, pero estudios recientes muestran que el rol ecológico, incluso en aquellos endófitos que manifiestan asociaciones benéficas con pastos (grupo de los clavicipetaceos), puede ser complejo e inestable (Saikkonen *et al.* 2004).

A esto, se le suma que muchos endófitos luego de vivir por un tiempo como simbioses neutrales, pueden llegar a causar síntomas, siempre y cuando se den las condiciones ambientales, fisiológicas y ecológicas apropiadas (Bettucci *et al.* 2004); en menor proporción es conocido el rol y los tipos de interacción en endófitos del grupo de los no clavicipetaceos (Rodríguez *et al.* 2008).

Las relaciones entre endófitos y saprótrofos, así como también entre endófitos y patógenos han sido estudiadas, planteándose que los hongos endofíticos se convertirían en saprótrofos cuando los tejidos del hospedero entraran en periodo de senescencia (Wong & Hyde, 2001). Menor es la evidencia de su comportamiento como patógenos (Schulz *et al.* 1999; Faeth & Fagan, 2002).

La relación endófito – saprótrofo es difícil de demostrar, puesto que la mayoría de los estudios en hongos endófitos han tenido como objetivo el aislamiento e identificación de la comunidad endofítica, careciendo de análisis que demuestren las posibles relaciones filogenéticas entre estos en un mismo hospedero colonizado (Arnold, 2001). La existencia de relaciones filogenéticas cercanas entre endófitos y saprótrofos, podría ser entendida como una ventaja por parte de aquellos endófitos en cuanto a la utilización de los recursos disponibles cuando órganos vegetativos y/o reproductivos entran en senescencia o podredumbre. Esto es corroborado mediante el aislamiento de especies saprofitas a partir de tejidos en senescencia, que a su vez han sido aisladas como endófitos de tejidos asintomáticos (Promputtha *et al.* 2007).

En cuanto a la relación endófito – patógeno, al igual que la relación anterior, muchos patógenos han sido aislados como endófitos de tejidos asintomáticos (Mostert *et al.* 2000). Por otra parte, otros tipos de estudios demuestran que cuando se somete al hospedero a situaciones de estrés, las defensas de este se deterioran y al ser inoculado con determinadas especies endofíticas (que normalmente no producen síntoma) estas se comportan como patógenos produciendo así síntomas de enfermedad (Kuldau & Yates, 2000).

Estudios más recientes muestran que los patógenos no representan una fracción importante de la diversidad de hongos endofitos, ya que por ejemplo Sánchez-Márquez y colaboradores 2007, aislaron de *Dactylis glomerata* 109 especies endofíticas, de las cuales solo 5 son patógenos conocidos de los pastos.

En síntesis, un hongo asociado a tejidos asintomáticos de un hospedero cualquiera, puede ser un “patógeno débil” o “levemente virulento” detectado durante su latencia como organismo endófito. Es decir un organismo ocupando un nicho determinado que espera una oportunidad para propagarse, y por lo tanto, cuando se dan las condiciones necesarias, comportarse como patógeno o saprofito (Schulz & Boyle, 2005).

Las distintas formas de interacción generan que la definición de endófito sea ampliada por muchos investigadores, incluyendo así a organismos que habitan los tejidos internos de las plantas de manera neutral, benéfica o perjudicial (Sikora *et al.* 2007).

En cuanto a los tipos de transmisión de los hongos endofíticos, existen dos tipos: vertical y horizontal (Figura 1), ambas ya nombradas en los puntos anteriores.

Transmisión horizontal: es la transmisión del hongo de una planta a otra, a través de esporas sexuales o asexuales.

Transmisión vertical: es la transmisión del hongo a la siguiente generación a través de las semillas del hospedero.

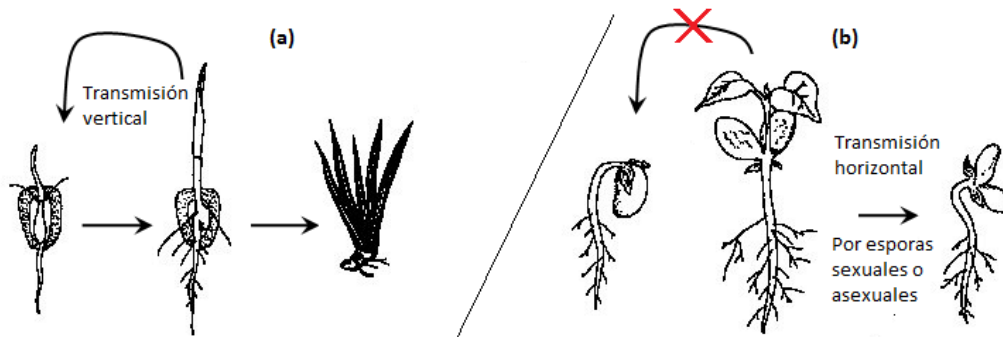


Figura 1. Se muestran los dos tipos de transmisión observados en hongos endófitos: (a) vertical, a través de las semillas de la planta madre y (b) horizontal, mediante la producción de esporas de origen sexual y asexual.

La transmisión horizontal parece ser el mecanismo predominante de dispersión entre especies endofíticas en las plantas leñosas. Pero existe la siguiente paradoja: para que ocurra transmisión horizontal, los endófitos asociados deben esporular y dispersarse. Pero en un hospedero asintomático, ¿dónde y cuándo ocurre la producción del inóculo? (Zabalgogezcoa, 2008).

Una explicación plausible es que en saprófitos latentes, el inóculo que infecta nuevos hospederos se produciría cuando los tejidos del hospedero entran en senescencia (Zabalgogezcoa, 2008). Como ya se cito anteriormente, ciertas especies han sido aisladas de tejidos muertos (como saprófitos) y a su vez de tejidos asintomáticos como endófitos (Promputtha *et al.* 2007).

Por último la transmisión vertical es común en hongos clavicipetáceos, y muy conocida en especies del género *Neotyphodium* spp. y *Epichloë* spp., los cuales son transmitidos a la descendencia mediante la infección de las semillas. Estas semillas darán lugar a plantas infectadas asintomáticamente (Schardl *et al.* 2004). El hongo en este tipo de transmisión será propagado a través de micelio presente en el embrión y la capa de aleurona (Zabalgogezcoa, 2008).

Cuando los tejidos vegetales senescen y son invadidos por algunos hongos endófitos, estos producen enzimas que llevan a cabo la degradación de los distintos componentes biopoliméricos de los tejidos.

1.5. Enzimas fúngicas

Al año se producen aproximadamente unas 4×10^9 y 0.8×10^9 toneladas de celulosa y lignina respectivamente en el planeta tierra. Por más exorbitantes que estos números sean, no existe una acumulación masiva de estos compuestos, producto de la existencia de hongos y bacterias que degradan tales componentes (Ortiz, 2009).

La degradación de esta biomasa vegetal es un proceso complejo que necesita de la acción en conjunto de un gran número de enzimas extracelulares (Aro *et al.* 2005).

Vale destacar que este gran número de enzimas no solo participa en los procesos de reciclaje, sino que también son factores de virulencia de microorganismos fitopatógenos, vía que permite el ingreso al interior de las plantas por parte de los mismos (Dong *et al.* 2001).

Dado que las paredes celulares vegetales se componen de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y pectina, que están unidos con proteínas y lignina formando una estructura rígida y compleja, tres de los sistemas enzimáticos estudiados en este trabajo son: celulasas, ligninasas y pectinasas.

Celulosa: es el polisacárido más abundante en la naturaleza y es el componente mayoritario de las paredes celulares vegetales. El contenido de celulosa depende del grupo taxonómico al que las plantas pertenezcan, oscilando entre el 35 y 50% del peso seco (Martínez-Anaya *et al.* 2008).

La celulosa se encuentra formada por unidades repetitivas de D-glucosa unidas por enlaces β -1.4 glucosídicos que forman cadenas poliméricas lineales (Figura 2) (Alexander, 1967).

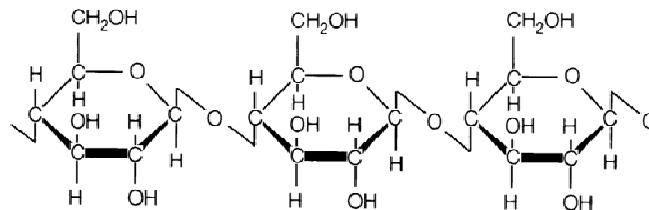


Figura 2. Estructura química de la celulosa. Se muestra las unidades de D-glucosa unidas en cadena lineal por enlaces β en los átomos de carbono 1 y 4 de la molécula de glucosa.

El arreglo de las moléculas de celulosa en las paredes vegetales es jerárquico: partimos de una configuración tridimensional que es el resultado de la unión de 30 protofibrillas lineales compuestas por 10.000 a 14.000 moléculas de glucosa. El segundo nivel consiste en la unión de protofibrillas para así formar microfibrillas de celulosa; por último estas se ensamblan para formar fibras de celulosa, que se entrelazan con moléculas de lignina y hemicelulosa (Martínez-Anaya *et al.* 2008).

La celulosa presenta como característica particular la presencia de una región compuesta por fibras ordenadas llamada región cristalina (Figura 3), la cual es el resultado de una organización muy compacta entre los componentes de las microfibrillas. La naturaleza estructural de esta región la hace insoluble en la mayoría de los solventes, incluso el agua, evitando que sea atacada por enzimas microbianas. Por otro lado hay una región que se compone de fibras desordenadas llamada región amorfa (Figura 3), con microfibrillas en forma de rosca o vueltas, mucho menos compacta que la región cristalina. Por esta razón, la celulosa amorfa tiene la capacidad de absorber moléculas de agua que le confieren flexibilidad y solubilidad, lo cual es crucial para su biodegradación (Gaitán & Pérez, 2007; Martínez-Anaya *et al.* 2008).

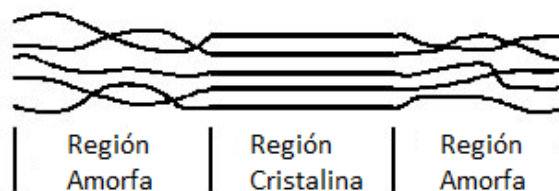


Figura 3. Se muestra los dos tipos de organización observados en las fibras de celulosa: región cristalina y región amorfa.

La degradación de celulosa es un proceso complejo que implica un sistema compuesto por tres enzimas: endo β -1,4 glucanasa, exo β -1,4 celobiohidrolasa y β -1,4 glucosidasa (Zhang *et al.* 2006).

La endo β -1,4 glucanasa hidroliza al azar los enlaces β -1,4 glucosídicos intramoleculares produciendo oligosacáridos de varias longitudes. Su actividad es medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización como es el caso de la carboximetilcelulosa (CMC). La exo β -1,4 celobiohidrolasa es la encargada de cortar los extremos no reductores de los productos generados por la primera enzima actuante,

generando así celobiosa o glucosa. Por último, la β -1,4 glucosidasa finaliza el proceso hidrolítico convirtiendo la celobiosa en glucosa o removiendo la glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos (Zhang *et al.* 2006).

Pectina: es el heteropolisacárido más complejo desde el punto de vista estructural y funcional de las paredes celulares vegetales. Presenta funciones en el crecimiento de las plantas, morfología, desarrollo y defensa frente a patógenos. Representa del 0,5 al 4% del peso seco de la planta, siendo las paredes de los frutos que una planta produce, los órganos más ricos en este compuesto (Jayani *et al.* 2005; Mohnen, 2008).

La estructura primaria de la pectina está constituida por dos regiones bien definidas: la región lisa y la región pilosa (Figura 4).

Región lisa: también llamada homogalacturonano, presenta un esqueleto formado por unidades repetitivas de ácido anhidrogalacturónico (α -D-galacturonano), y donde los grupos carboxilo de estos pueden estar parcialmente esterificados con metanol, y parcial o completamente neutralizados por una o más bases (Voragen *et al.* 2001; Rojas, 2009).

Región pilosa: también llamada ramnogalacturonano, en esta se distinguen dos estructuras diferentes:

-Por un lado tenemos el ramnogalacturonano de tipo I, constituido por residuos alternos de α -D-galacturonano unidos a través enlaces α -1,4, y unidades de L-ramnosa (2 a 4%) unidas mediante enlaces α -1,2 y α -1,4. A estos residuos de ramnosa se le unen cadenas de D-galactosa o en otros casos L-arabinosa, y a su vez, en ocasiones pueden originarse ramificaciones formadas por otros azúcares como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa, ácido D-glucurónico, dependiendo del vegetal (Contreras, 2003; Rojas, 2009).

-Por último el ramnogalacturonano de tipo II se conforma de residuos de α -D-galacturonano a los cuales se le unen directamente cadenas laterales de diferentes azúcares a través de los carbonos C1 y C2 (Blanco *et al.* 1999; Contreras, 2003; Rojas, 2009).

Con todo lo citado anteriormente, se indica que las sustancias pécticas están presentes en varias formas en las células vegetales, lo que explicaría la existencia de varias formas de enzimas pectinolíticas (Jayani *et al.* 2005).

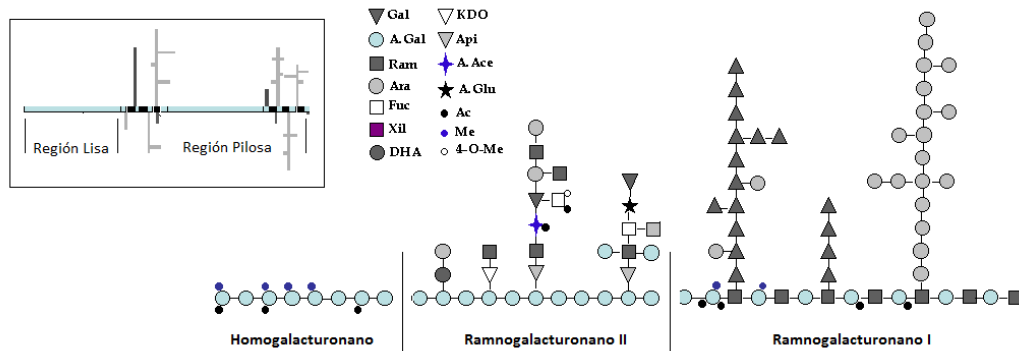


Figura 4. Se muestran las dos regiones encontradas en el heteropolisacárido: región lisa y región pilosa. Tomado y modificado de Voragen *et al.* 2001.

Debido a esto, la Sociedad Química Americana (*The American Chemical Society*) clasificó a las sustancias pécticas en 4 tipos principales:

- (1) Protopectina: sustancias pécticas insolubles en agua, presentes en tejidos intactos.
- (2) Ácido péctico: polímero de galacturonanos solubles, que contiene cantidades insignificantes de grupos metoxilo.
- (3) Ácidos pectínicos: es la cadena principal de poligalacturonanos que contiene entre 0 y 75% de unidades metiladas de galacturonanos.
- (4) Pectina (Polimetil galacturonato): es el material polimérico en el cual al menos el 75% de los grupos carboxilo de las unidades de galacturonanos están esterificadas con metanol. Esta confiere rigidez cuando se encuentra en la pared celular unida a la celulosa.

Las enzimas encargadas de degradar la pectina, llamadas comúnmente pectinasas, constituyen un complejo sistema enzimático donde se incluyen hidrolasas, liasas y oxidasas que intervienen en la degradación o modificación de la pectina (Rojas, 2009). Estas enzimas pectinolíticas eran clasificadas en 3 grupos: (1) Protopectinasas, (2) Esterasas y (3) Depolimerasas. Pero el avance en la investigación generó que esta

clasificación se volviera obsoleta, producto de que la misma tomaba en cuenta únicamente las enzimas que actuaban sobre la región lisa, desconociéndose hasta ese momento aquellas que actuaban sobre la región pilosa (Jayani *et al.* 2005; Rojas, 2009).

Las enzimas que actúan sobre ambas regiones son clasificadas en: Depolimerizantes y Desesterificantes, ambas actuantes sobre sustratos solubles. Las primeras, clasificadas según: tipo de ruptura de los enlaces glicosídicos: hidrolítico o transeliminativo; mecanismo de reacción: endo o exo y preferencia de actividad sobre el grado de esterificación metílica del sustrato (alta o baja). Mientras que las segundas se clasifican según el grupo éster que hidrolizan, ya sea metil, acetil o feruil éster.

Por otra parte ciertos autores describen una clase extra de pectinasas cuya acción ocurre sobre sustratos insolubles, las llamadas Protopectinasas. Estas degradan la protopectina insoluble, dando lugar a la pectina polimerizada altamente soluble. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que enzimas actuantes sobre sustratos solubles evidenciarían un mecanismo de acción semejante a las Protopectinasas, por lo que las mismas no deberían ser clasificadas como un grupo adicional.

A modo de resumen, las enzimas que actúan sobre el esqueleto principal de la molécula de pectina son: poligalacturonasas, polimetilgalacturonasas, pectin y pectato liasas. Mientras que las que actúan sobre los ramnogalacturonanos son: α -L-arabinofuranosidasas, endoarabinasas, α y β galactosidasas, endo y exo-galactanasas, feruloil y p-coumaril-esterasas, acetil y metil-esterasas. Por último tenemos otras enzimas actuantes como lo son la galacturónico oxidasa y la ácido urónico oxidasa (Voragen *et al.* 2001; Jayani *et al.* 2005; Rojas, 2009).

Lignina: es el polímero más recalcitrante que existe en la naturaleza, y cuya hidrofobicidad, estructura (aleatoria y compleja) y carencia de enlaces hidrolizables la hacen resistente a la degradación por parte de microorganismos degradadores de celulosa. La misma comprende del 10 al 30% del peso seco de las plantas (Moore & Jung, 2001; Ortiz, 2009; Laura & Castellanos, 2009).

Es un polímero insoluble, complejo y ramificado de unidades fenilpropano sustituidas, las cuales se unen por enlaces éter o carbono-carbono, formando una extensa red

dentro de la pared celular vegetal (Figura 5). Estos enlaces son los que determinan que la lignina sea un polímero recalcitrante (Ortiz, 2009).

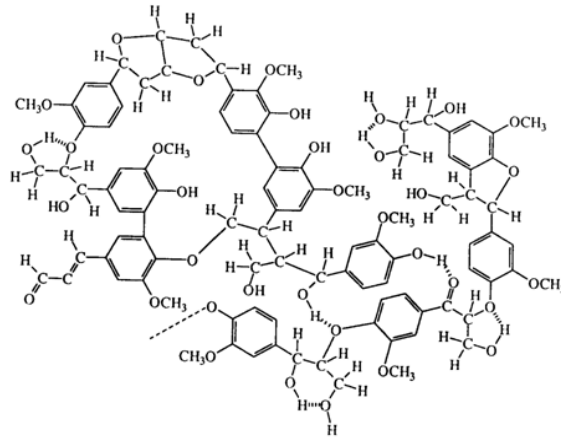


Figura 5. Se muestra la estructura general de la lignina.

Los hongos causantes de la pudrición blanca, son los únicos organismos capaces de degradar la lignina eficientemente hasta su completa mineralización, siendo la mayoría miembros de la clase Basidiomycetes, aunque existen reportes de ciertos Ascomycetes y Levaduras (Steffen *et al.* 2002; Mouso *et al.* 2003; Olvera, 2003).

La degradación de la lignina implica la existencia de sistemas enzimáticos que implican el ataque de esta mediante oxidaciones. Estas enzimas se encargan de catalizar las primeras reacciones que rompen las uniones dentro de la compleja molécula de lignina, generando así moléculas más pequeñas, que luego se incorporan a los ciclos metabólicos del organismo, que como producto final dan dióxido de carbono (CO₂) (Papinutti *et al.* 2003).

Las enzimas lignolíticas descritas en la actualidad son 4: magnesio peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa versátil (PV) y lacasa, las cuales existen en diferentes combinaciones en los hongos generadores de podredumbre blanca (Mouso *et al.* 2003).

Las primeras tres enzimas, son peroxidosas con un grupo hemo como cofactor y emplean peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como primer aceptor de electrones (Papinutti *et al.* 2003).

La lignina peroxidasa oxida directamente sustratos aromáticos no fenólicos. La magnesio peroxidasa se encarga de oxidar el Mn²⁺ a Mn³⁺, siendo este último quelado

por ácidos orgánicos sintetizados por el propio hongo. Esto significa que la MnP puede oxidar sustratos de tipo fenólico a través de Mn^{2+} , pero también puede oxidar aquellos no fenólicos a través de los productos de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Pérez & Jeffries, 1992; Tour *et al.* 1992; Bao *et al.* 1994).

La peroxidasa versátil puede oxidar el Mn^{2+} a Mn^{3+} como lo hace al MnP, pero también puede oxidar compuestos no fenólicos como lo hace la LiP, por lo que comparte propiedades catalíticas de ambas enzimas, de ahí su nombre de versátil (Martínez, 2002).

Por último, la lacasa es una oxidasa con cuatro átomos de cobre como cofactor y cuyo aceptor de electrones es el oxígeno (O_2), dando agua como producto. La enzima oxidada ataca sustratos fenólicos, aunque en presencia de determinados compuestos, la misma ataca compuestos más difícilmente oxidables de tipo no fenólico. Esta enzima es la que presenta una distribución más amplia entre los hongos generadores de podredumbre blanca (Bourbonnais *et al.* 1997).

1.6. Producción de metabolitos bioactivos

La expresión “metabolitos microbianos bioactivos” es el resultado del descubrimiento de compuestos biológicos con alguna actividad antimicrobiana (Deshpande *et al.* 1988).

La búsqueda de nuevos productos para las industrias farmacéuticas y agroquímicas es un proceso que requiere una optimización continua, por lo que es relevante considerar que: (1) los metabolitos secundarios que un hongo sintetiza se pueden corresponder con su nicho ecológico y (2) las interacciones metabólicas pueden potenciar la síntesis de estos (Schulz *et al.* 2002).

Ya en 1994, Dreyfuss & Chapela, predecían que los hongos endofíticos representaban un recurso extenso y a su vez inexplorado de nuevos y útiles metabolitos con actividad antimicrobiana.

Los esfuerzos por el hallazgo de estos compuestos se potenciaron cuando en el año 1996, Strobel y colaboradores encontraron que el Taxol, fármaco anticancerígeno producido por especies arbóreas del género *Taxus* spp., era también producido por hongos endófitos del género *Pestalotiopsis* spp. que residían dentro de estos árboles.

En 2002, Schulz y colaboradores luego de aislar 6500 hongos endófitos, y evaluar su potencial biológico en la producción de metabolitos secundarios, hallaron 135 compuestos bioactivos, de los cuales 51% representaban un recurso nuevo, validando la predicción de Dreyfuss & Chapela.

En 2005, el número de metabolitos con propiedades bioactivas, provenientes de microorganismos superaba los 20.000 (Bérdy, 2005), siendo los hongos, el grupo más importante de eucariotas explorados (Suryanarayanan *et al.* 2009). Algunos de los compuestos más conocidos son los pertenecientes a la familia de las penicilinas, cefalosporinas y aflatoxinas, entre otros.

Estos componentes pueden derivar del metabolismo primario o secundario del organismo. Los metabolitos primarios como polisacáridos, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos son comunes a todos los organismos vivos y las vías de síntesis de estos son altamente conservadas en la escala evolutiva. En cambio los metabolitos secundarios presentan bajo peso molecular, caracterizándose por ser extremadamente variables (química y taxonómicamente), siendo producidos por organismos específicos

como hongos, bacterias y algunos metazoos (Bérdy, 2005; Brakhage & Schroeckh, 2011).

En hongos, los genes codificantes para las enzimas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran en grupos cuya longitud puede alcanzar los centenares de kilobases. Estos al ser co-expresados traducen enzimas multiméricas involucradas en la biosíntesis de los metabolitos. Entre las que se destacan poliketido sintasas, sintasas peptídicas no ribosomales, prenilttransferasas y terpeno ciclasas, entre otras; así como también proteínas reguladoras de las mismas (Keller & Hohn, 1997; Brakhage & Schroeckh, 2011).

Aunque los sustratos pueden diferir considerablemente, estas enzimas son multi modulares y muestran similaridad en la forma de asociación al sustrato y en su manera de actuar, donde cada modulo es responsable de un determinado paso en la elongación de cada compuesto secundario (Brakhage & Schroeckh, 2011).

Estos grupos se caracterizan por una evolución rápida a través de múltiples arreglos, duplicaciones y pérdidas, además pueden sufrir propagación interespecífica a través de transmisión horizontal génica (Khaldi *et al.* 2008).

Todas las propiedades anteriormente descritas conducen bajo determinadas condiciones, a la síntesis de nuevos y variables metabolitos con bioactividad (Bérdy, 2005). Decimos “bajo determinadas condiciones”, producto de que se ha visto que puede existir silenciamiento génico bajo condiciones estandarizadas de laboratorio (Hertweck, 2009).

Por otra parte, la capacidad de sintetizar compuestos tan versátiles por parte de los hongos, también es el reflejo de su modo de nutrición (heterótrofos por absorción), y su habilidad de explotar una amplia gama de nutrientes y ambientes (Hyde, 2005).

Algo importante es que el hallazgo de compuestos bioactivos, no es un “simple paseo al azar por el bosque” (Schulz *et al.* 2002), sino que se debe cumplir con estrategias razonables en la elección de las plantas de las cuales vamos a obtener esos compuestos (Yu *et al.* 2010). Algunas de las características a tomar en cuenta, para la selección del hospedero son: (1) plantas provenientes de áreas hiperdiversas, ya que son a su vez las que presentan comunidades endófitas hiperdiversas también (Strobel *et al.* 2004); (2) plantas creciendo en hábitats especiales, sobre todo en ambientes deteriorados ecológicamente, ya que estas poseen capacidades especiales de

supervivencia (Kumaresan & Suryanarayanan, 2001); (3) plantas rodeadas a su vez de plantas infectadas por patógenos pero que no manifiestan síntomas (Tuntiwachwuttikul *et al.* 2008); (4) plantas que han sido explotadas como plantas medicinales ya que muchos de los compuestos son producidos por organismos endófitos (Ji *et al.* 2005) y (5) plantas con distribuciones restringidas a ciertos lugares (Strobel & Daisy, 2003).

La comparación de hospederos muestra que plantas medicinales, cultivares y plantas en ambientes especiales (Figura 6) han sido los más frecuentemente estudiados para identificar compuestos antimicrobianos.

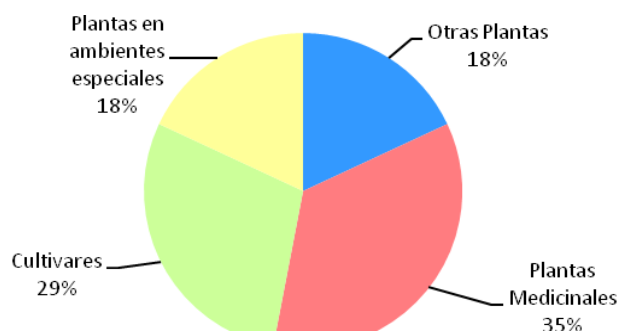


Figura 6. Proporción de compuestos biológicos activos aislados de diferentes tipos de plantas, y testeados para actividades antimicrobianas en investigaciones recientes. Tomado y modificado de Yu *et al.* 2010.

Sintetizando lo dicho en los puntos 1.4. (Interacción y tipos de transmisión) y 1.6. (Producción de metabolitos bioactivos). Decimos que: según la hipótesis propuesta por Schulz y colaboradores 1999, las interacciones planta hospedera – hongo patógeno y planta hospedera – hongo endófito, involucran un constante antagonismo mutual, en parte basado en los metabolitos secundarios producidos por ambos constituyentes de la interacción. Donde la primera interacción se dice que es no balanceada resultando en síntoma de enfermedad, mientras que la segunda interacción representa un antagonismo balanceado (Schulz *et al.* 1999). Por último se plantea que para una eficiente explotación de su nicho ecológico, los endófitos necesitan competir con otros endófitos, patógenos y hasta el propio hospedero, por lo que los metabolitos secundarios tienen un rol importante en este proceso (Gamboa-Gaitán, 2006).

1.7. Utilización de Técnicas moleculares

La sistemática de hongos es una parte esencial de la investigación biológica, especialmente en el contexto de sus implicancias ecológicas y económicas (Shenoy *et al.* 2007).

En particular, la identificación de los hongos endófitos no siempre es factible en tanto estos permanecen estériles. La ausencia de esporulación pudo haber dificultado en el pasado la taxonomía de estos organismos, pero en la actualidad y debido a la existencia de técnicas moleculares de amplificación de regiones específicas (reacción en cadena de la polimerasa) esto ha dejado de ser un problema. A su vez, estas técnicas permiten la confirmación de aquellos aislados fúngicos en los cuales el género o la especie se alcanzan a través de la utilización de claves específicas, permitiendo así solventar dudas a nivel taxonómico. Por otra parte también permiten, de una forma alternativa, la estimación de comunidades fúngicas mediante la extracción total de ADN y la amplificación de determinadas regiones (Hyde & Soyong, 2008).

Los datos de secuencias moleculares del ARN ribosómico (Figura 7) han sido los más utilizados para identificar micelios estériles (Sánchez-Márquez, 2009).

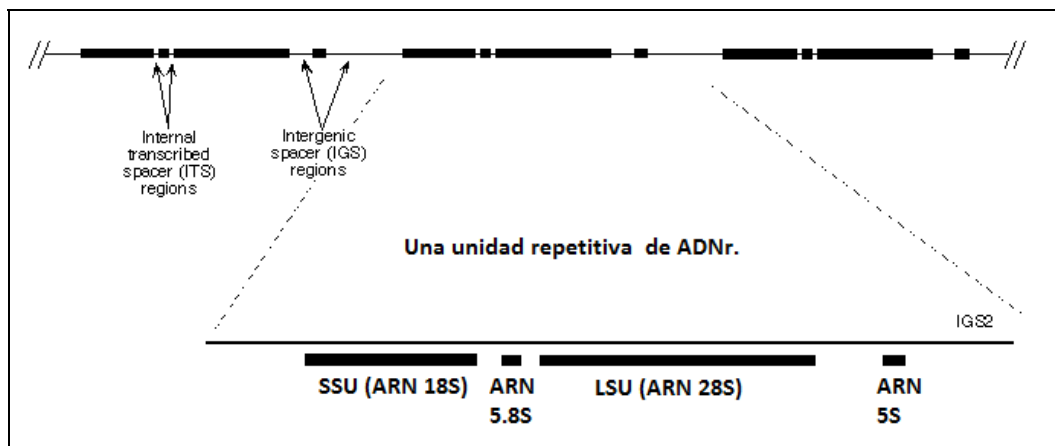


figura 7. Representación esquemática de la unidad repetitiva de ADNr. SSU, subunidad pequeña (*Small Subunit*). LSU, subunidad larga (*Large Subunit*). ITS, espaciador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*). IGS, espacio intergénico (*Intergenic space*), región no transcrita que separa los repetidos. S, coeficiente de sedimentación *Svedberg*. Tomado y modificado de Vilgalys, 1990.

Este complejo de genes cuyas repeticiones en tándem se encuentran desde una a miles de copias por genoma, presentan universalidad y homología a lo largo de la

escala evolutiva. Además presentan dominios cuya evolución es variable, lo cual es una ventaja para diferentes tipos de estudios (Sreenivasaprasad *et al.* 1996).

Los ARNr 18S y 28S evolucionan relativamente lento, esto los hace útiles para hipótesis filogenéticas de un gran rango de organismos a una escala evolutiva primitiva (Bruns *et al.* 1991). La región ITS evoluciona relativamente rápido por lo que es utilizada para determinar relaciones inter e intraespecíficas (Baura *et al.* 1992). Por último, la región no codificante IGS, que flanquea los genes 18S y 28S, evoluciona a una tasa que permite estudios a nivel poblacional (Appel & Gordon, 1996).

También vale destacar la existencia y creciente disponibilidad de secuencias en bases de datos de libre acceso, que permite la comparación con secuencias nuevas, así como la elección de grupos externos para análisis filogenéticos, haciendo a estos genes excelentes herramientas para estudios taxonómicos y evolutivos a nivel fúngico (Sánchez-Márquez, 2009).

1.8. Familia Myrtaceae

Esta familia de plantas presenta una amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales, con centros de dispersión en América, así como también en el este y sudoeste de Australia (Figura 8), donde son muy diversas. La familia comprende desde pequeños arbustos hasta enormes árboles como es el caso de *Eucalyptus*.

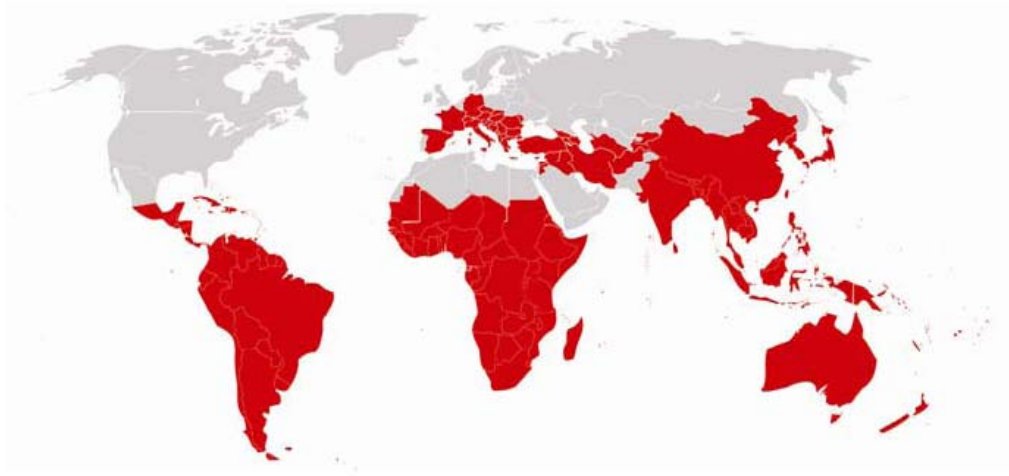


Figura 8. Mapa donde se muestra la distribución mundial de la familia Myrtaceae. Tomado de Zomlefer 1994.

Dependiendo de los autores la misma se divide de 2 a 4 subfamilias, aunque tradicionalmente se ha optado por la primera opción.

Dos grandes subfamilias: Leptospermoideae y Myrtoideae, principalmente divididas en base al tipo de fruto que presentan: fruto carnoso (baya o drupa) y cápsula o fruto seco indehisciente. La primera subfamilia se distribuye principalmente en Australia y la segunda en América del Sur y América Central (Jolochin 2008; Zomlefer, 1994; Heywood, 1967).

Presenta aproximadamente unas 4620 especies incluidas en unos 131 géneros, siendo los más numerosos: *Eugenia* (1000 spp.), *Syzygium* (500 spp.), *Eucalyptus* (450-500 spp.) y *Mircia* (250-500 spp.) (Heywood, 1967; Zomlefer, 1994). La mayor parte de las especies arbóreas y arbustivas de la flora uruguaya pertenecen a esta familia, contando con 31 especies y 2 variedades (Jolochin, 2008).

***Eugenia uruguayensis* Cambess.** Especie arbórea nativa, que pertenece a la subfamilia Myrtoideae, fue descrita por el naturalista y botánico francés Jacques Cambessèdes (IPNI, 2010; Jolochin, 2008; Wilson et al., 2001, 2005).

Más conocida como guayabo blanco, es un árbol pequeño, de 5 a 12m de altura, con corteza caediza en placas. Hojas simples, opuestas, oval lanceoladas a elíptico lanceoladas, acuminadas, margen entero, cartáceas, concoloras o levemente discoloras, opacas. Presenta una flor de color blanco, con: 4-5 sépalos libres, 4-5 pétalos libres, androceo con estambres numerosos, gineceo con ovario ínfero y prolongación del hipantio, siendo el periodo de floración a mediados de primavera y verano. Mientras que el periodo de fructificación es a fin de verano y otoño, dando lugar a una baya oblongo de color rojiza. Las semillas son de testa crustácea; el embrión presenta cotiledones unidos, con una línea interna de separación (Brussa & Grela, 2007; Cardoso & Sajo, 2004, Heywood, 1967) (Figura 9).



Figura 9. En (a) se muestra el tronco presentando maculas típicas formando manchas a lo largo del mismo, que son características de la especie. En (b) y (c) se visualizan las hojas simples, en disposición opuesta, oval lanceoladas y de margen entero. Por último en (d), se ve el fruto del guayabo en diferentes estados de maduración, emergiendo estos de las axilas de las hojas. (Imágenes cedidas por Cesar Fagundez).

Esta especie habita bosques ribereños, entiéndase como aquellos bosques que ocupan las zonas bajas a los márgenes de los cursos de agua y bosques serranos, aquellos que cubren las serranías rocosas; presentando una amplia distribución en Uruguay; encontrándola también en países limítrofes como Argentina y Brasil y no limítrofes como Paraguay (Brussa & Grela, 2007).

E. uruguayensis presenta dos morfotipos, uno de ellos es encontrado en la zona del río Uruguay en los departamentos de Paysandú y Salto, mientras que su variable de hoja más ancha, es la que se encuentra distribuida ampliamente en todo el país (Jolochin, 2008).

2. Objetivos

Objetivo general

Identificación de la microbiota endofítica de las estructuras reproductoras, evaluación de su capacidad degradadora de biopolímeros y de producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Objetivos específicos:

- 1- Aislamiento e identificación de la microbiota endofítica asociada a las estructuras reproductivas del guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*).

- 2- Evaluación de la potencial capacidad degradadora de los hongos aislados, basado en la producción de enzimas celulasas, ligninasas y pectinasas.

- 3- Evaluación de la producción de metabolitos secundarios con potencial actividad antimicrobiana.

3. Metodología

3.1. Muestreo

El área de muestreo fue seleccionada en base a registros publicados sobre la distribución de la especie *Eugenia uruguayensis*, siendo: Parador Tajés, Departamento de Canelones, Uruguay ($34^{\circ}36'24.67''S$; $56^{\circ}28'32.13''O$) (Brussa & Grela, 2007). En dicho lugar, en el período de floración se colectaron 10 ramas provenientes de 5 árboles seleccionados al azar (2 ramas por cada árbol) conteniendo primordios florales. En el período de fructificación se colectaron de la misma manera 10 ramas de los 5 árboles muestreados en el periodo de floración, conteniendo frutos en diferentes estadios de desarrollo. La Figura 10 muestra una fotografía aérea del lugar, así como también las coordenadas de los respectivos árboles muestreados.

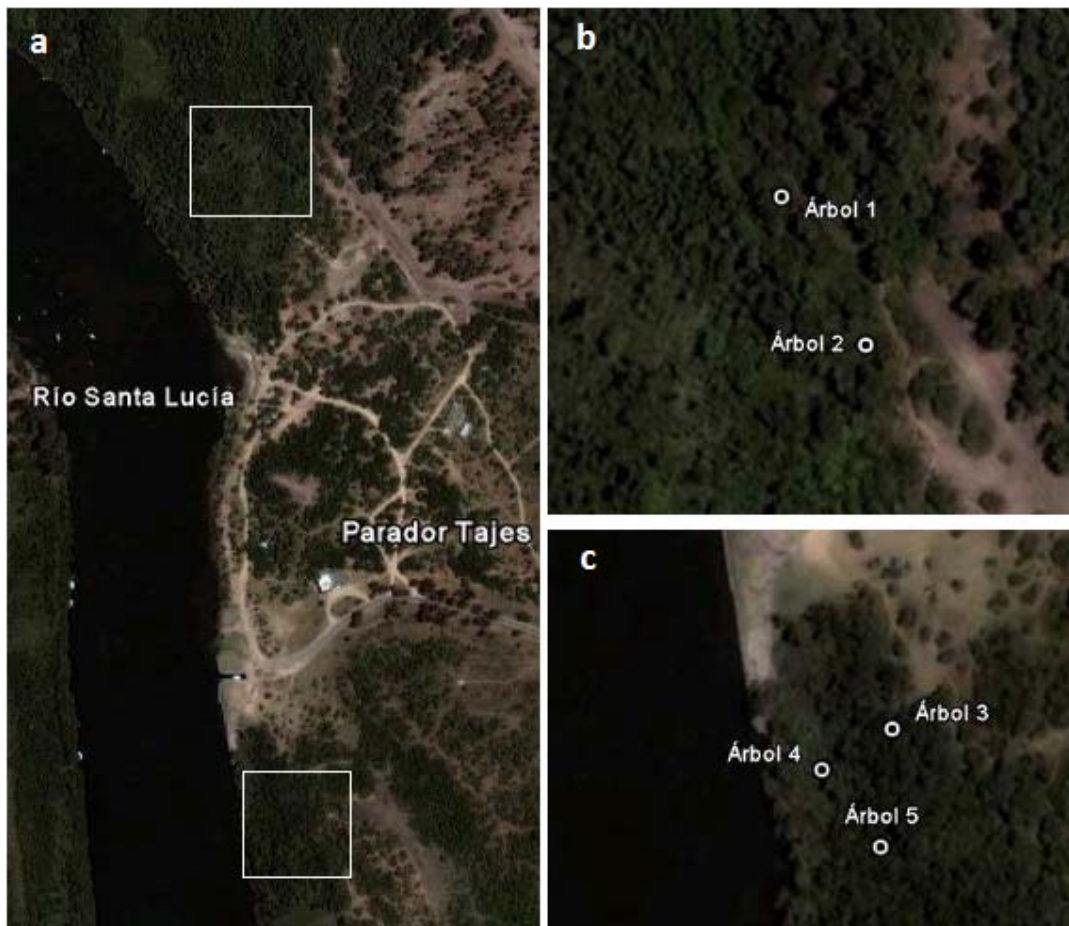


Figura 10. En (a) se muestra una fotografía aérea del lugar de muestreo a las orillas del Río Santa Lucía. El recuadro en la parte superior de la figura se muestra ampliado en la figura b, mientras que el recuadro inferior se muestra ampliado en c. En (b) se muestra la ubicación del Árbol 1 (⊙) ($34^{\circ}36'10.50''S$; $56^{\circ}28'33.60''O$) y del Árbol 2 (⊙) ($34^{\circ}36'11.80''S$; $56^{\circ}28'32.70''O$). En (c) se muestra la ubicación del Árbol 3 (⊙) ($34^{\circ}36'30.05''S$; $56^{\circ}28'34.00''O$), Árbol 4 (⊙) ($34^{\circ}36'30.41''S$; $56^{\circ}28'34.75''O$) y Árbol 5 (⊙) ($34^{\circ}36'31.09''S$; $56^{\circ}28'34.11''O$). (Imágenes obtenidas del Google Earth, Enero 2, 2006).

3.2. Procesamiento de las muestras

Una vez colectadas, las ramas fueron colocadas en bolsas de polietileno, y procesadas 24hs más tarde en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ingeniería.

El procesamiento implicó la recolección total de Primordios Florales y Frutos en diferentes estados de desarrollo, provenientes de las 20 ramas, para luego someterlas a un proceso de esterilización superficial. Para ello se sumergió consecutivamente en alcohol 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sodio (0.4% cloro activo) durante 2 minutos, y por último, se enjuagó con abundante agua destilada estéril, secándose con papel de filtro estéril absorbente.

Se inocularon por separado pedúnculos, primordios florales, sépalos, frutos y semillas, en cajas de Petri conteniendo MEA (Agar Extracto de Malta al 2% adicionado con cloranfenicol, 100mg/l), colocándose 10 segmentos por placa. Se inocularon 100 segmentos de cada material. Para verificar la eficacia del proceso de esterilización superficial, se realizaron impresiones de los segmentos esterilizados en placas de Petri conteniendo el mismo medio. La ausencia de crecimiento en el medio estaría indicando un efectivo procedimiento de esterilización superficial (Schulz *et al.*, 1993).

Las cajas se incubaron a 25°C y las colonias de hongos emergentes fueron aisladas sobre medio fresco para su identificación y finalmente transferidos a tubos de ensayo conteniendo MEA para su conservación a 4°C.

3.3. Identificación de los hongos aislados

3.3.1. Identificación mediante características morfológicas

Las especies de hongos endófitos fueron identificadas mediante las características macro y micromorfológicas de los cuerpos fructíferos y/o esporas, a través de la utilización de claves específicas, mediante la observación con lupa estereoscópica y microscopía óptica de los materiales preparados con azul de lactofenol.

Aquellos cultivos que no formaron estructuras reproductivas fueron clasificados como “micelios estériles”, procediendo a realizarles amplificación de regiones específicas del ADN mediante el uso de técnicas moleculares para su respectiva identificación.

3.3.2. Identificación Molecular

El primer paso fue la extracción del ADN a través del procedimiento propuesto por Lee & Taylor (1990) como se muestra en el Anexo 1. La confirmación de la extracción se llevó a cabo a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador molecular 100 bp DNA Ladder (AXYGEN), y su correspondiente visualización con luz ultra violeta.

Una vez verificados los productos de extracción, se procedió a amplificar la región ITS1- 5.8S ARNr –ITS2 (Figura 11) por PCR, mediante un procedimiento estandarizado y la utilización de primers ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') (White *et al.* 1990).

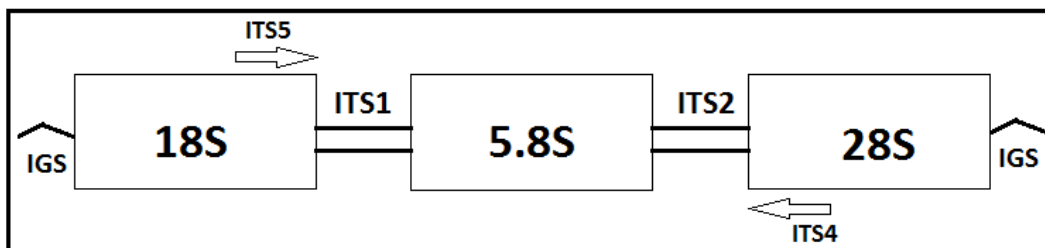


Figura 11. Representación de la región ITS1- 5.8S ARNr –ITS2 (600pb aprox.) indicando a su vez el lugar de hibridación de los primers ITS5 (hebra sentido) e ITS4 (hebra antisentido). S, coeficiente de sedimentación *Svedberg*. ITS, espaciador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*). IGS, espacio intergénico (*Intergenic space*), región no transcrita que separa los repetidos.

El mix de amplificación se correspondió a un volumen total de 50 μ l, conteniendo: 5 μ l de Buffer 10X K^+ , 1.5 μ l de MgCl (50mM), 5 μ l de dNTPs (10mM), 1.0 μ l de primers ITS4 e ITS5 (10mM), 0.5 μ l de *Taq* ADN polimerasa (*Fermentas*), 4 μ l de ADN genómico y 32 μ l de H_2O_{mq} (*Fermentas*).

El programa de amplificación correspondió a: 1 ciclo de 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C/1 minuto, 42°C/1,5 minutos y 72°C/1,5 minutos y un ciclo final de extensión de 72°C, durante 5 minutos.

La confirmación de los productos de PCR se llevó a cabo a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% como previamente se describió.

Por último, tales productos fueron secuenciados en los Laboratorios MACROGEN, Corea; y dichas secuencias alineadas filogenéticamente con el software MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011), y posteriormente comparadas con secuencias de la base de datos

del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), mediante la realización de un BLAST (Altschu *et al.* 1990).

Con este mismo procedimiento se corroboró la identificación de todas las especies encontradas y de los aislados pertenecientes al género *Phomopsis* spp, estos últimos clasificados en diferentes morfotipos debido a la existencia de características macromorfológicas particulares.

3.4. Estudio Enzimático

La potencial actividad degradadora de los hongos aislados se fundamentó en la determinación de 3 enzimas específicas, siendo éstas: celulasas, pectinasas y ligninasas. Para ello se utilizaron tres medios de cultivo.

3.4.1. Celulasas. Se utilizó un medio de cultivo que contiene carboxi-metil-celulosa (medio CMC) (Eggins & Pugh, 1962). Se inoculó cada hongo en cajas de Petri conteniendo CMC (3 réplicas) y se incubó a 25°C hasta que se observó crecimiento micelial. Se realizó un revelado mediante la incorporación de un colorante (Rojo Congo al 0.25%) y la actividad celulasa fue visualizada como un aclaramiento alrededor de las colonias. Se midió el crecimiento micelial y el halo de clareado.

La actividad enzimática se expresó semi-cuantitativamente como el cociente entre los diámetros de las zonas que presentaron halo y los de las colonias. Los valores menores a uno, indican zonas degradadas solamente debajo de la colonia, mientras que los valores mayores, estarán indicando la difusión de las enzimas en el medio, resultando en una zona degradada alrededor de la colonia.

Como control se utilizó una cepa de *Trichoderma atroviride* perteneciente a la colección del laboratorio de micología.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{Halo de clareado}}{\text{Halo micelial}}$$

3.4.2. Pectinasas. Se utilizó un medio de cultivo que contenía como única fuente de carbono pectina cítrica. Se inoculó cada hongo por triplicado y la actividad

pectinasa fue determinada mediante tinción diferencial del colorante Rojo de Rutenio (zonas de coloración más intensas alrededor de las colonias) (Cruickshank & Wade, 1980). La actividad enzimática se expresó de la misma forma que la actividad celulasa. Como control se utilizó una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* perteneciente a la colección del laboratorio de micología.

3.4.3. Ligninasas. La actividad ligninasa se determinó inoculando los hongos en un medio específico que contenía el colorante polimérico *RBBR* (Azul Brillante de Remazol R / *Remazol brilliant blue R*) como sustituto de la lignina (Glenn & Gold, 1983). Se realizaron 3 réplicas de cada colonia, se incubó a 25°C, y se examinaron las zonas de aclaramiento en el medio alrededor de las colonias (15 días después). Aquellas cepas que decoloraron fueron clasificadas con un símbolo (+), mientras que las que no, con un símbolo (-).

Como cepa control se utilizó el Basidiomycete: *Pycnoporus sanguineus*

3.5. Obtención y evaluación de metabolitos bioactivos

Se partió de cultivos puros en placas conteniendo MEA. El micelio más el agar de cada colonia se seccionó en cuadrículas con bisturí estéril, colocándose en frascos estériles. La extracción de los metabolitos se realizó mediante la adición de un solvente orgánico (Acetato de Etilo), el cual al evaporarse, nos permite obtener un extracto con los metabolitos.

Se evaluó su capacidad antimicrobiana frente a bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*) y hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*) patógenos humanos y de plantas. Se aplicó la técnica de antibiograma impregnando los metabolitos en discos de papel estériles, los cuales se colocaron en cajas de Petri inoculadas con dichos microorganismos y se evaluó la inhibición del crecimiento mediante la formación de halo.

3.6. Análisis de Datos

La frecuencia relativa de aislamientos (*FRA*), se calculó como el número de segmentos colonizados por un hongo, dividido por el número total de segmentos expresado como porcentaje (Bettucci *et al.* 2004):

$$FRA = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de segmentos colonizados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de segmentos}} \times 100$$

Por otra parte se determinó la diversidad fúngica a través del cálculo del índice de diversidad de Shannon (H'). Este índice toma en cuenta dos aspectos importantes de la diversidad de especies: la riqueza de las especies y la uniformidad de la distribución del número de individuos de cada especie (Sánchez-Márquez, 2009; Yuan *et al.* 2010):

$$H' = - \sum p_i \ln p_i \quad p_i = \frac{N_i}{N}$$

Siendo p_i la proporción de individuos de la especie i en la comunidad, medida como la razón del número de individuos de la especie i (N_i) sobre el número total de individuos (N). La diversidad fue medida para cada tejido y órgano mediante este índice.

Se calcularon las curvas de acumulación de especies. Estas permiten estudiar la riqueza de especies de una población, mostrando el número de especies identificadas conforme se aumenta el esfuerzo del muestreo. La curva de riqueza aumenta hasta que se alcanza un número máximo de especies, y por más que se aumente el muestreo la curva se estabiliza en una asíntota. Para el cálculo de las mismas se utilizó el programa *EstimateS* 8.2. (Colwell *et al.* 2004).

Por último, también se evaluó con el programa STATISITCA 8.0 la existencia de diferencias en la composición endofítica de los órganos inoculados, usando un análisis de correspondencias simple. Este es una técnica estadística que construye un diagrama cartesiano basado en la asociación entre las variables analizadas. En este, la proximidad entre los puntos se relaciona con el nivel de asociación de los mismos. En otras palabras, este análisis muestra las relaciones de dependencia-independencia de un conjunto de variables categóricas (Salvador, 2003).

4. Resultados

4.1. Aislamiento e identificación morfológica

De un total de 700 segmentos inoculados pertenecientes a 100 pedicelos, 100 primordios florales, 100 pedúnculos, 100 frutos, 100 sépalos, 100 testas de semillas y 100 cotiledones, se obtuvieron 377 aislados correspondientes a 37 taxa. Siendo los géneros más frecuentes: *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria* y *Trichoderma*. El mayor número de aislamientos se obtuvo en pedúnculo de fruto, mientras que el más bajo fue encontrado en cotiledones y testa de semilla (Figura 12). Por otra parte, el único género encontrado en todos los órganos inoculados fue *Phomopsis* spp.

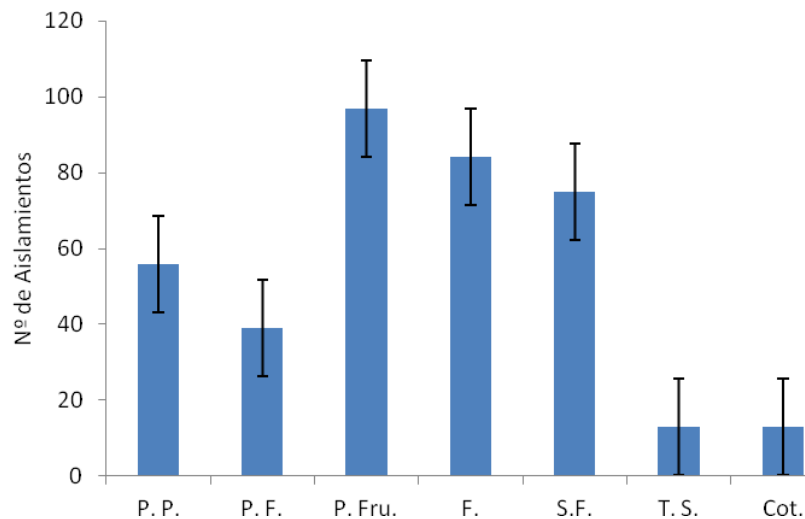


Figura 12. Número de aislamientos totales obtenidos en 100 segmentos de cada órgano inoculado. P.P.: Pedúnculo Primordio; P.F.: Primordio Flor; P.Fru.: Pedúnculo Fruto; F.: Fruto; S.F.: Sépalos Fruto; T.S.: Testa Semilla; Cot.: Cotiledones.

Descripción de los hongos endófitos que fueron identificados a través de cuerpos fructíferos y/o esporas:

Alternaria alternata Keissl

Colonias usualmente negras o verde oliva oscuro con tonos grisáceos en medio MEA. Conidióforos derivados por separados o en pequeños grupos, simples, derechos o flexibles, pálidos a medio marrones. De paredes lisas, con tamaños mayores a los 50µm de largo, y un espesor que ronda los 3 a 6µm. Conidios formados a menudo en

cadena ramificada, presencia de un pico corto cónico o cilíndrico, pálidos a medio marrones dorados, lisos y con abundante presencia de septos (Figura 13).

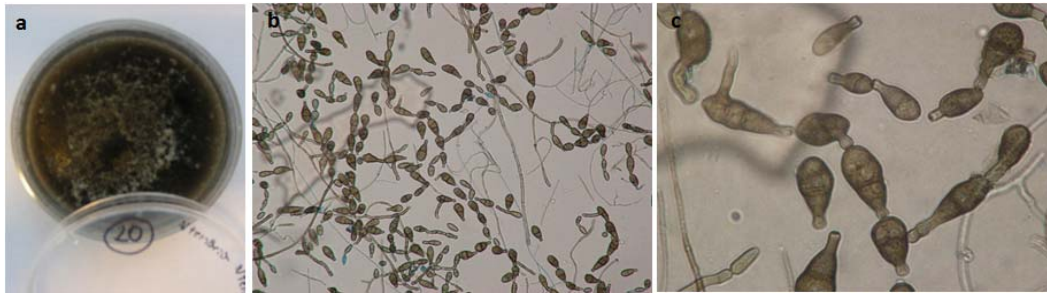


Figura 13. En (a) se muestra la morfología de la colonia. En (b), a 10x claramente se visualizan conidios en cadenas, característicos de la especie, y en (c), a 40x se distingue el pico cónico de los conidios así como también la abundante presencia de septos.

Botryosphaeria dothidea (Moug.) Ces & De Not

Colonias inicialmente blancas que se tornan verde grisáceo a verde oscuro. El reverso de la colonia al inicio es blanco pero a los pocos días se torna verde oscuro a verde oliva. Conidiomas grandes, que presentan esporulación aproximadamente a las 3 semanas de inoculación en medio Agar-Agua + Acícula de Pino, no esporulando en medio MEA. Conidios fusiformes a fusiformes elípticos con ápice obtuso y base subtruncada a redonda. Algunos con presencia de septos (0-2), de color hialinos, lisos y con contenido granular, presentando un tamaño promedio de 22,5-25 μm de largo por 4-6 μm de ancho (Figura 14).

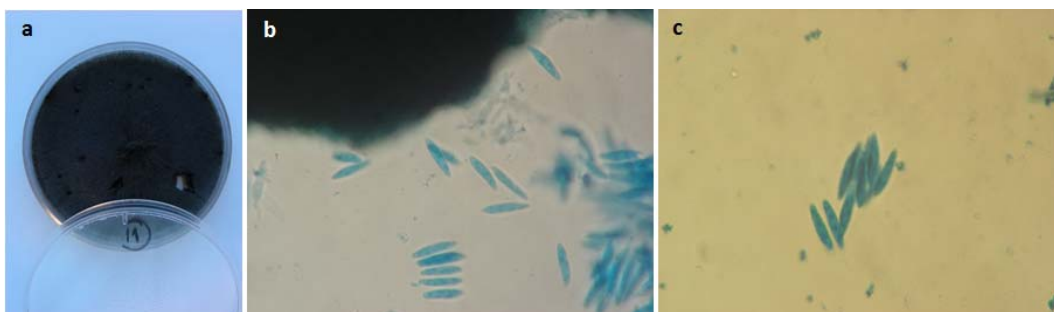


Figura 14. En (a) se visualiza la característica morfológica de la colonia. En (b) y (c), a 40x se muestran conidios fusiformes característicos de *Botryosphaeria dothidea*.

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) de Vries

Colonias efusas y aterciopeladas, verde oliva o marrón oliváceo, siendo el reverso negro verdoso en agar malta-cloranfenicol. Conidióforos macronematos y micronematos, pálidos a marrón oliva, lisos o verruculosos. Presencia de ramo

conidios, lisos u ocasionalmente verruculosos. Conidios de pared lisa, formados en largas cadenas ramificadas, carente de septos, elipsoidales o limoniformes, cuyo tamaño promedia los 3-7 μ m x 2-4 μ m, pálidos a marrón oliva (Figura 15).



Figura 15. En (a) se muestra macroscópicamente la colonia de color verde olivo. En (b) y (c) se observa a nivel microscópico los conidióforos

Colletotrichum acutatum Simmonds

Colonias densas, de crecimiento radial, con micelio aéreo, que se torna rosa o naranja grisáceo, siendo el reverso de la colonia en MEA rosado. Conidios fusiformes con presencia de gúttulas, cuyo tamaño promedia los 15 μ m x 4 μ m, presentándose en masas, de color rosado salmón. Ausencia de esclerocios (Figura 16).

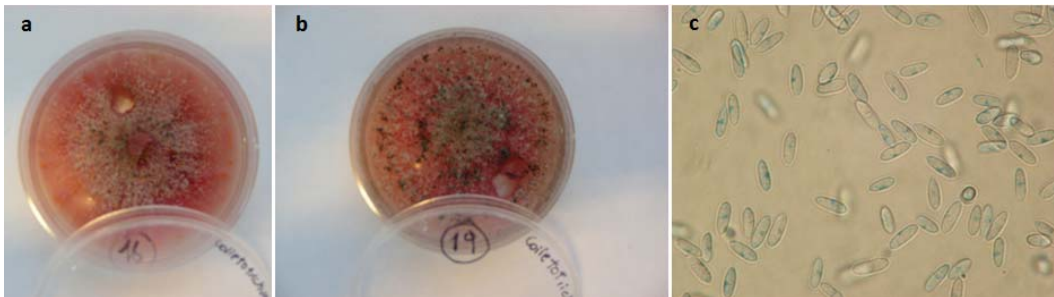


Figura 16. En (a) y (b) se observa la colonia a nivel macroscópico, evidenciando que cuanto más vieja es la colonia (b), más gris oscuro se torna la misma. En (c) se muestran los conidios fusiformes, donde se ve claramente la presencia de bótulas.

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz & Sacc

Colonias densas, con micelio aéreo, que se torna salmón claro o naranja pálido, pudiendo contener tonos grisáceos. Conidios en masas, color naranja pálido, de morfología recta, obtusos en el ápice, con un tamaño promedio de 12-20 μ m x 3-4 μ m (Figura 17).

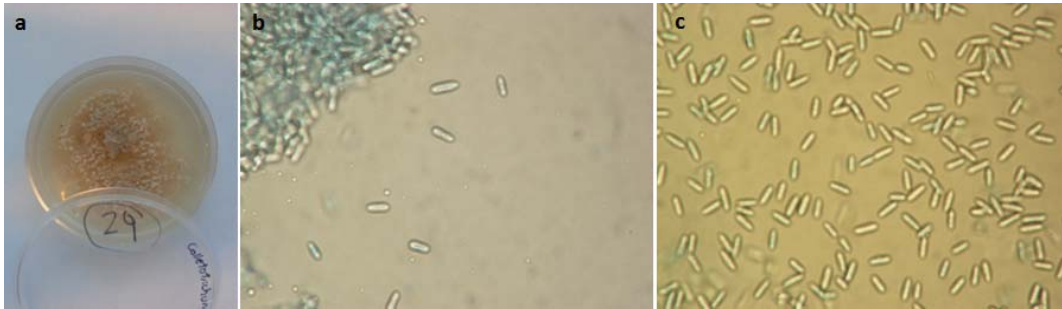


Figura 17. En (a) se expone la colonia inoculada en medio MEA, visualizando el color salmón claro. Mientras que en (b) y (c) se ven a 40x los conidios característicos de *C.gloesporioides*.

Diplodia pinea (Desm.) Kickx

Colonias con micelio inmerso o superficial, marrón oscuro, ramificado y septado. Conidioma de tipo picnidial, globosos, marrones oscuros de pared delgada, con conidióforos ausentes. Conidios oblongos a claviformes, rectos y aseptados, de pared delgada, ornamentados en la cara interior de la pared, presencia de ápice obtuso con base truncada (Figura 31).

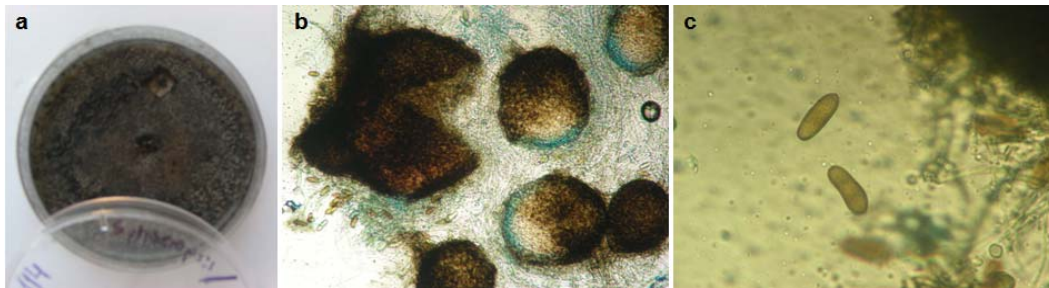


Figura 31. En (a) se muestra la colonia. En (b) se observan distintos conidiomas, con conidios emergiendo. Mientras que en (c) se observan los conidios característicos de la especie.

Epicoccum purpurascens Ehrenb

Colonias de crecimiento rápido, de color amarillo tenue que se torna naranja oscuro. Conidióforos cortos, sin distinción y en grupos. Conidios color marrón oscuro, globosos que presentan tabiques en todas direcciones, las cuales son observados como pequeños puntos negros a simple vista en la colonia (Figura 18).

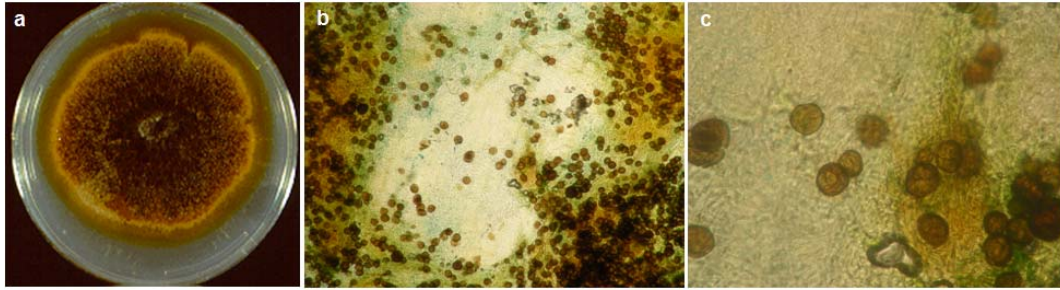


Figura 18. En (a) se muestra la colonia con su coloración particular. En (b) se observan a 10X muchos conidios juntos, mientras que en (c) se amplía lo visto en (b).

Fusarium graminearum Schwabe

En MEA, colonias de crecimiento moderado, con abundante micelio aéreo algodónoso, de color naranja con tonos rojo, de esporulación tardía.

En PDA, colonias de crecimiento rápido, con micelio aéreo denso, de color amarillo con márgenes blancos a rojo carmín, siendo el reverso rojo carmín.

En CLA, microconidios ausentes. Abundante presencia de macroconidios, de pared gruesa, septados, rectos a moderadamente curvados, cuya característica distintiva es la diferenciación marcada de la célula basal (Figura 19).

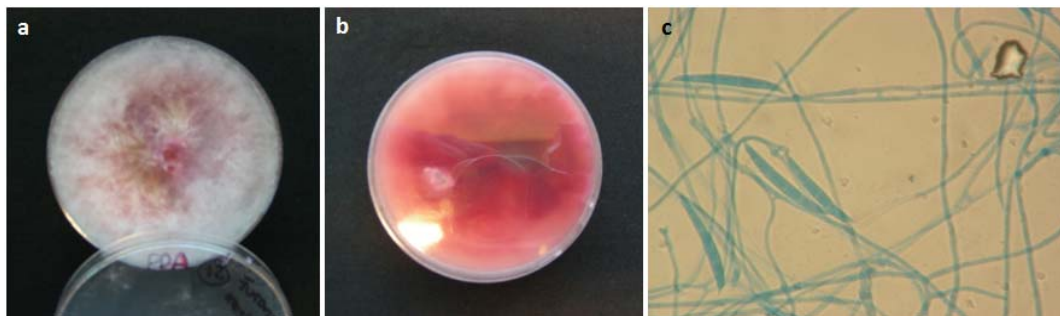


Figura 19. Las figuras (a) y (b) muestran las características morfológicas de la colonia creciendo en PDA, observando en (b) la tinción rojo carmín característica de *F. graminearum*. Por último en (c) se visualiza los macroconidios a 40x, característicos de la especie, así como la ausencia de microconidios.

Fusarium lateritium Nees

En MEA, colonia con crecimiento lento, micelio algodónoso, inmerso que tiñe el medio.

En PDA, crecimiento lento, con micelio aéreo esparcido, de color blanco a rosa tenue, a la reversa tiñe el medio de color naranja pálido.

En CLA, crecimiento lento, con esporulación retrasada y presencia de clamidosporas individuales. Microconidios poco abundantes, esparcidos, de morfología elipsoidal.

Macroconidios abundantes, generalmente cilíndricos, pero también curvados y cuyas características distintivas son: presencia de septos paralelos, y el gancho o pico característico que exhibe la célula apical (Figura 20).

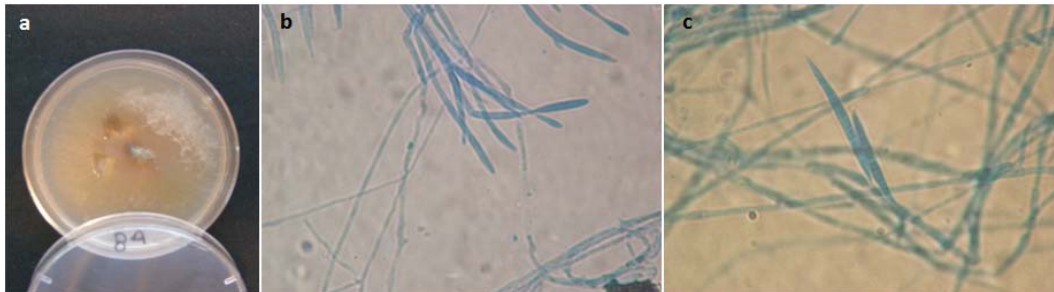


Figura 20. La figura (a) muestra la colonia creciendo en PDA, con el medio teñido de naranja tenue. En (b) y (c) se observan a 40x macroconidios (con varios septos y de mayor tamaño), así como la presencia de microconidios (pocos septos y de menor tamaño, figura f).

Gliocladium catenulatum Gilman & Abbott

Colonias blanquecinas que con el tiempo se tornan verde, con un centro algodonoso, donde el reverso es verde intenso. Dos tipos de conidióforos: los primarios son verticilados, con fiálides divergentes que se presentan en grupos, mientras que los secundarios, son densamente penicilados, de pared dentada.

Los conidios generados en ambos tipos de conidióforos son asimétricos, naviculados, de color verde claro (Figura 21).



Figura 21. En (a) se observa la colonia de *G. catenulatum* con su centro algodonoso. En (b) se especifica mediante un círculo, la presencia de conidióforos de tipo penicilados, mientras que en (c) se observa conidióforos de tipo verticilados. Tanto en (b) como en (c) se observa la presencia de conidios con el pliegue particular de la especie.

Glomerella cingulata (Stoneman) Spauld & Schrenk

Colonias de rápido crecimiento, flocosa, micelio aéreo, marrón oscuro. Ascoma con peritecio ostiolado, piriforme a subgloboso.

Ascos unitunicados de pared delgada, en general cilíndricos a elipsoidales, redondeados, sésiles o levemente cortos. Ascosporas hialinas, biseriadas, elipsoidales o subcilíndricas, rectos o curvados (Figura 22).

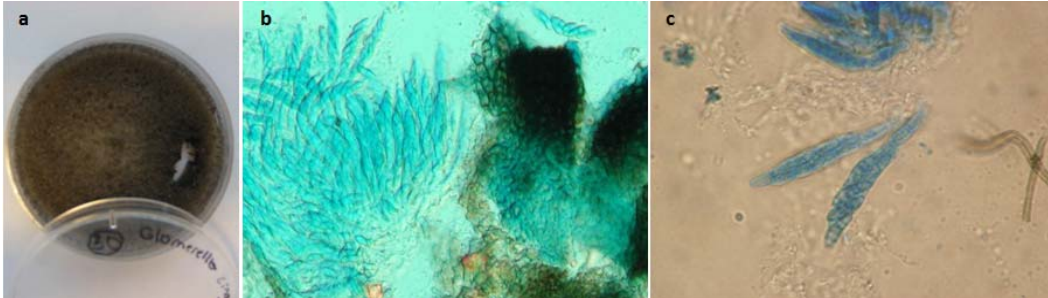


Figura 22. En (a) se muestra la colonia. En (b) se observan ascos con ascosporas, mientras que en (c) se observa amplificado lo visto en (b).

Khuskia oryzae Huds

Colonias de crecimiento rápido, micelio algodónoso, al comienzo blanco que luego se torna verdoso con conidios negros brillosos pequeños.

Conidióforos de 3-7 μ m de espesor, células conidiógenas de 6-9 μ m de diámetro y conidios mayoritariamente de 12-14 μ m de diámetro, simples, esféricos, lisos y carentes de septos (Figura 23).

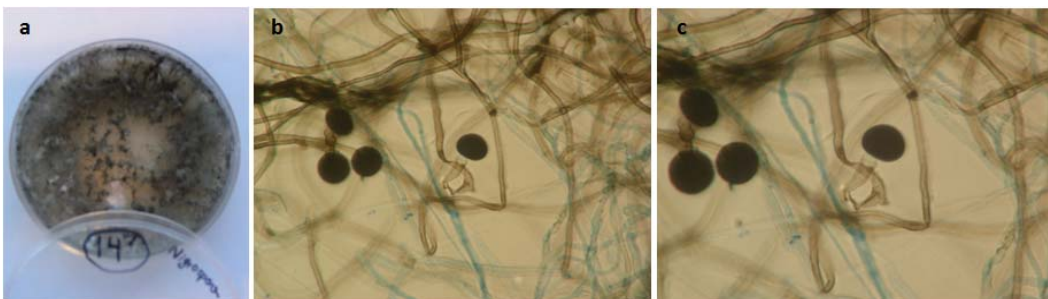


Figura 23. La figura (a) muestra la vista morfológica de la colonia en medio MEA. En (b) se muestra un enfoque a 10x de los conidios, sostenidos por su respectivo suspensor. En (c) el enfoque se realiza a 40x.

Neofusicoccum parvum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips

Colonias con abundante presencia de micelio aéreo en medio MEA, y cuyo color es verde opaco. El reverso de la colonia al inicio es blanco pero se torna verde oscuro a verde oliva. Esporulación aproximadamente a las 3 semanas de inoculación en medio Agar-Agua + Acícula de Pino, no esporulando en medio MEA. Conidios hialinos, gutulados, carentes de septos, de paredes lisas, fusiformes a fusiformes elipsoidales,

con ápice subobtusos y base truncada o redonda. Presentando un tamaño promedio de 17-20 μm de largo por 5-7 μm de ancho (Figura 24).

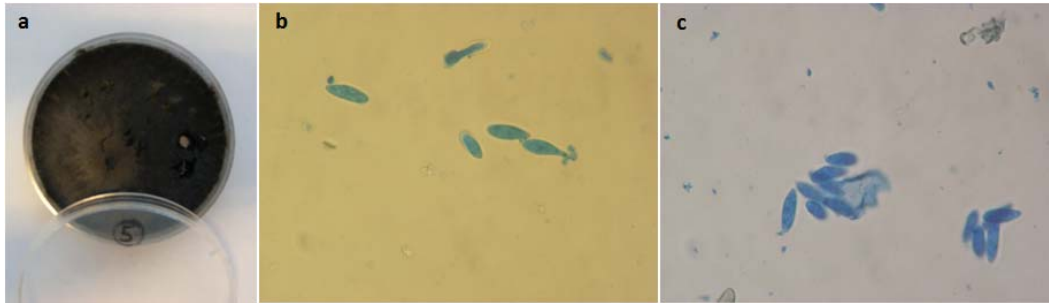


Figura 24. En (a) se muestra la morfología de colonia donde se evidencia el color verde opaco de la misma. En (b) y (c) se visualiza a 40x diferentes conidios y cuya morfología se describe en el texto.

Nigrospora sacchari (Speg.) Mason

Colonias de crecimiento rápido, micelio con poca elevación, al comienzo blancas con conidios negros brillosos pequeños, fácilmente visibles a bajo aumento en el microscopio, que luego se torna cada vez más oscura alcanzando el micelio un color verde oliva oscuro en los extremos pero blanco en el centro.

Conidióforos incoloros a amarronados, de textura lisa. Conidios que mayoritariamente promedian los 20-22 μm de diámetro, esféricos, lisos y sin septos (Figura 25).

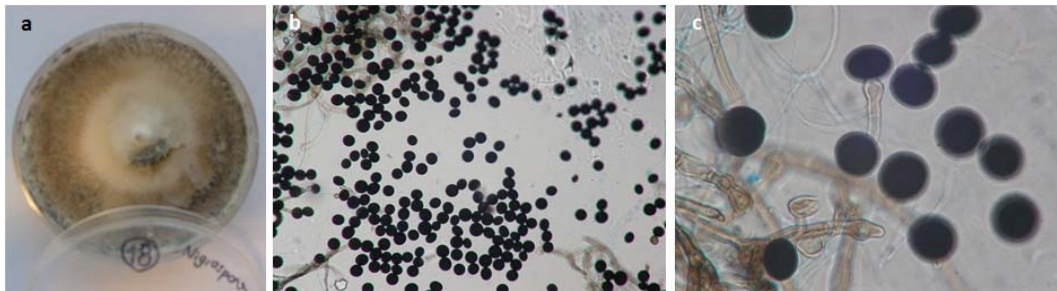


Figura 25. En (a) vemos la morfología de la colonia en medio MEA, distinguiéndola claramente de la especie de *Nigrospora* anterior, por contener menor cantidad de micelio aéreo, y por la presencia de un halo blanco central característico. La figura (b) muestra a 10 x la abundante masa de conidios que produce este hongo. Por último, en (c) se muestra en mayor detalle (40x) tales estructuras reproductoras.

Nigrospora sphaerica (Sacc.) Mason

Colonias de rápido crecimiento, al comienzo blanquecinas con conidios negros brillosos pequeños que luego alcanza un color verde olivo oscuro en toda la superficie.

Conidióforos delgados de 4 a 8 μm . Células conidiógenas de 8 a 11 μm de diámetro y

presencia de conidios de 14 a 20 μ m, aunque mayoritariamente de 16 a 18 μ m (Figura 26).



Figura 26. En (a) se muestra la colonia de *N. sphaerica* que todavía no ha comenzado a esporular. En (b) y (c) se observan conidios característicos de la especie.

Pestalotiopsis guepini (Desm.) Steyaert

Colonias color blanco, de rápido crecimiento, que presentan micelio hialino inmerso y septado. Conidióforos hialinos, ramificados y septados en la base.

Conidios lisos, fusiformes, rectos a ligeramente curvados, con célula media concolora, con apéndices apicales y ápice obtuso con apéndices basales (Figura 27).



Figura 27. La figura (a) muestra la colonia de *P. guepini*. Mientras que en (b) y (c) se observa los conidios característicos de la especies.

Phaeomoniella sp. Crous & Gams

Colonias de crecimiento muy lento, cuya esporulación es muy tardía también. Presenta micelio septado, y ramificado, con presencia de hifas solas o en haces. Conidióforos monofialídicos, donde la célula terminal presenta una elongación-ampuliforme llamada colarete. Presencia de conidios hialinos a sub hialinos, oblongos, elipsoidales a abovados (Figura 29).

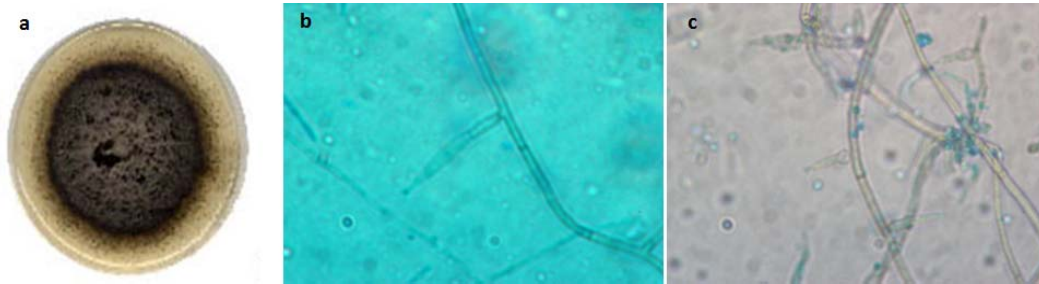


Figura 29. En (a) se observa macroscópicamente la colonia. En (b) y (c) se observa por un lado el esporangióforo monofialídico viéndose en la terminación el colarete, y por otro lado se visualizan conidios.

Phomopsis spp. (Sacc.) Bubák

Colonias de rápido crecimiento, cuyo color varía de blanco a crema, con cierta pigmentación del medio de cultivo en algunos casos.

Presenta micelio hialino inmerso, ramificado y septado. Conidios de dos tipos básicos: α (alfa) conidios, que son hialinos, cilíndricos, fusiformes y rectos, usualmente bigutulados (una gútula en cada extremo) pero muchas veces con múltiples gútulas, aseptados. β (beta) conidios: hialinos, filiformes, rectos o curvados, egutulados y aseptados (Figura 28).

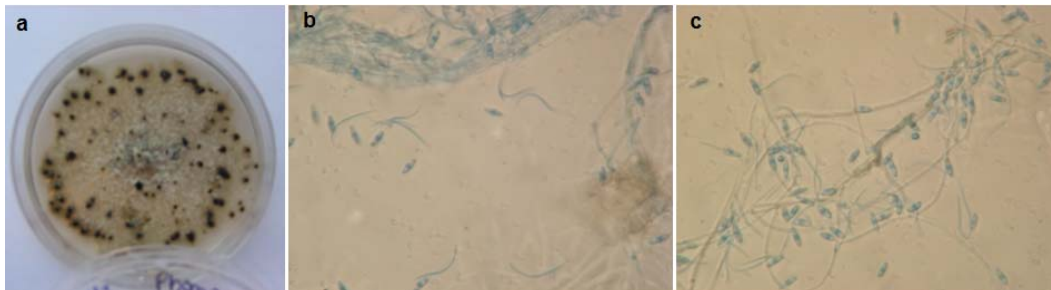


Figura 28. En (a) se muestra una colonia de *Phomopsis* spp. mientras que en (b) y (c) se observa la presencia de ambos tipos de conidios α y β .

Sordaria fimicola (Roberge ex Desm.) Ces & De Not

Colonias flocosas, con micelio inmerso en agar. Ascus unitunicados, cilíndricos con el ápice truncado.

Presencia de esporas arregladas uniseriadamente. Ascosporas de color marrón oscuras, en general fusiformes a ovoides o subglobosas, lisas con un poro basal característico (Figura 30).

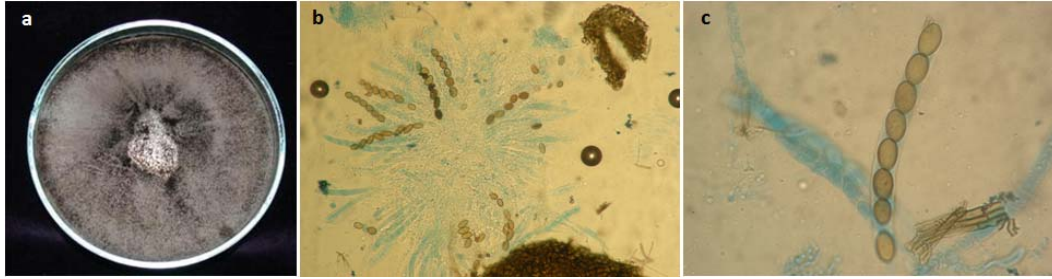


Figura 30. En (a) se observa la colonia de *S. fimicola*. En (b) se observan ascos dispuestos radialmente, En (c) se observa un ascos con ascosporas maduras color marrón.

Scytalidium sp. Pesante

Colonias efusas, marrones oscuras, que presentan micelio inmerso y a su vez superficial.

Presencia de hifas lisas, algunas marrones y cilíndricas, otras incoloras y un poco más gruesas, que son pálidas a medio marrones, con septos marrones muy oscuros (Figura 32).



Figura 32. Se observa en (a) macromorfológicamente la colonia de la especie. En (b) y (c) se observa el micelio toruloide característico de *Scytalidium* sp.

Trichoderma atroviride Bissett

Colonias de crecimiento rápido a 25-30°C, que al inicio son transparentes e inmersas en medio MEA o blancas y lanudas en medio PDA.

Esporulación que generalmente comienza las 72hs post-inoculación, con masas de conidios color verde oliva que tienden a ubicarse en los extremos de la colonia. Conidióforos muy ramificados que asumen una estructura piramidal que termina en unas pocas fiáldes. Conidios de pared lisa, globosos a sub-globosos de 2.8 a 4.8 μm de longitud y 1.5 a 2.0 μm de radio. Especie que produce compuestos volátiles que asemejan olor a coco (Figura 33).

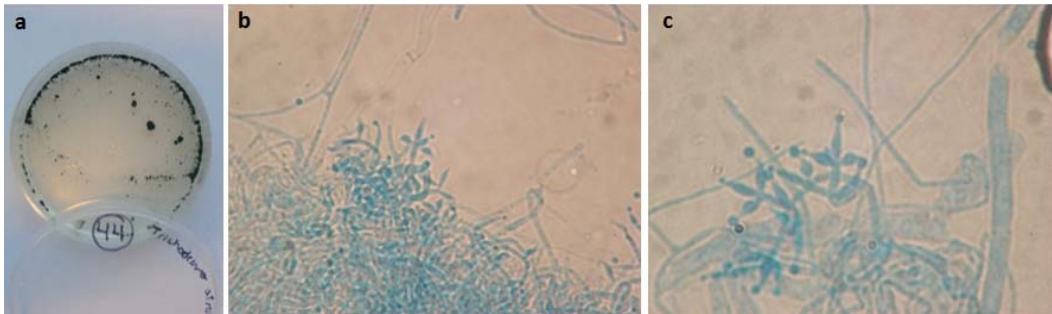


Figura 33. En (a) se muestra la colonia de *T. atroviride* con masas de conidios en los extremos de la placa. En (b) se muestra a 10X unos cuantos conidióforos de la especie. En (c) se amplía lo mostrado en (b), observándose claramente los conidios globosos.

Trichoderma harzianum Rifai

Colonias de crecimiento rápido a 25-30°C, que al inicio son transparentes e inmersas en medio MEA o blancas y lanudas en medio PDA.

Esporulación que generalmente comienza las 72hs post-inoculación, con masas de conidios color verde oliva que tienden a ubicarse en forma de un anillo radial.

Conidióforos muy ramificados que asumen una estructura piramidal que termina en unas pocas fiálides, siendo estas más cortas y de un ancho mayor que *T. atroviride*.

Conidios de pared lisa, sub-globosos a ovoides de 2.8 a 3.4 μm de longitud y 1.2 a 1.5 μm de radio (Figura 34).

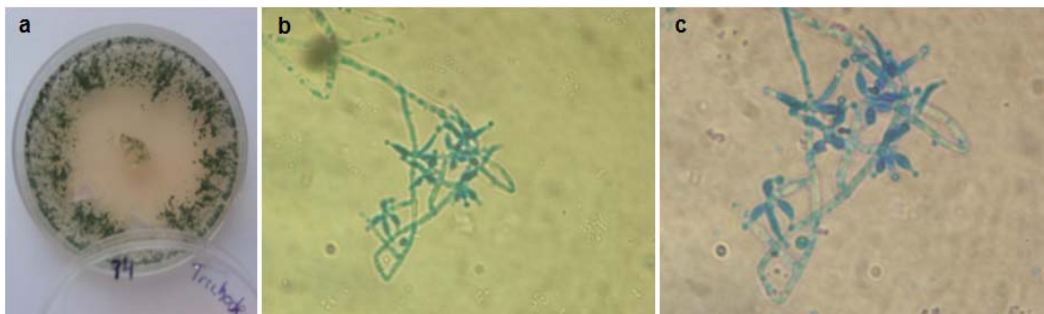


Figura 34. En (a) se observa el anillo radial de conidios que genera esta especie. En (b) se muestra a 20X unos cuantos conidióforos de *T. harzianum*. En (c) se amplía lo mostrado en (b), observándose claramente las fiálides cortas y anchas, con conidios sub-globosos.

A continuación, la tabla 1 muestra el resultado de los aislamientos obtenidos para cada órgano, representado a través de la frecuencia relativa de aislamiento. En la misma se indica en color los géneros más frecuentes.

Tabla 1. Hongos endófitos aislados de estructuras reproductivas de *E. uruguayensis*. Se muestra la frecuencia relativa de aislamientos (FRA), calculada como el número de segmentos colonizados por un hongo, dividido por el número total de segmentos expresado como porcentaje. Ped.: Pedicelos; P.F.: Primordio Flor; P.Fru.: Pedúnculo Fruto; F.: Fruto; S.F.: Sépalos Fruto; T.S.: Testa Semilla; Cot.: Cotiledones.

Guayabo Blanco (<i>Eugenia uruguayensis</i>)							
Hongos identificados	Flor			Fruto			
	Ped.	P.F.	P. Fru.	F.	S.F.	T. S.	Cot.
<i>Alternaria alternata</i> Keissl			5	6	3		
<i>Bionectria ochroleuca</i> (Schwein) Schroers & Samuels				1			
<i>Botryosphaeria obtusa</i> (Schwein) Shoemaker				1			
<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug) Ces & De Not			2		1		
<i>Botryosphaeria ribis</i> Grossenb & Duggar				2			
<i>Botryosphaeria stevensii</i> Shoemaker	1			3			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries			2		2	2	1
<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds				3	4		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) Penz & Sacc	16	7	6	15	9		
<i>Colletotrichum phormii</i> (Henn) Farr & Rossman	2						
<i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc				2	7		
<i>Diplodia pinea</i> (Desm) Kickx	6						
Endófito fúngico (Ascomycete)			2				
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb			2	1		3	1
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe			2				
<i>Fusarium lateritium</i> Nees			3	1			
<i>Fusarium oxysporum</i> Sm & Swingle			3				
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman & Abbott		2					
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld & Schrenk					1		
<i>khuskia oryzae</i> Huds			1	1			
<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm) Zare & Gams							1
<i>Lophiostoma</i> sp. Ces & De Not				1			
<i>Neofusicoccum parvum</i> (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips		4	6		7		
<i>Nigrospora sacchari</i> (Speg) Mason				1			
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc) Mason			7	2			
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm) Steyaert			12	14	17		
<i>Phaeomoniella</i> sp. Crous & Gams			2				1
<i>Phomopsis</i> spp. (Sacc) Bubák	30	14	39	21	24	1	4
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm) Ces & De Not			2	2		2	
<i>Scytalidium</i> sp. Pesante				1			
<i>Trichoderma atroviride</i> Bissett	1	12		3		5	5
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai				2			
<i>Xylaria venosula</i> Speg				2			
Total segmentos inoculados	100	100	100	100	100	100	100
Total de aislados obtenidos	56	39	97	86	75	13	13
Total de taxa obtenidos	6	5	16	21	10	5	6

El índice de diversidad obtenido para la comunidad fúngica asociada a las estructuras reproductivas de *E. uruguayensis* fue de 2,412.

Mientras que el índice de diversidad obtenido para cada órgano inoculado fue de: pedicelos (1,17); primordio de flor (1,39); pedúnculo de fruto (2,076); fruto (2,21); sépalos (1,84); testa de semilla (1,45) y cotiledones (1,49). El mayor índice de diversidad fue observado en fruto, mientras que el menor en los pedicelos de los primordios florales (Figura 35).

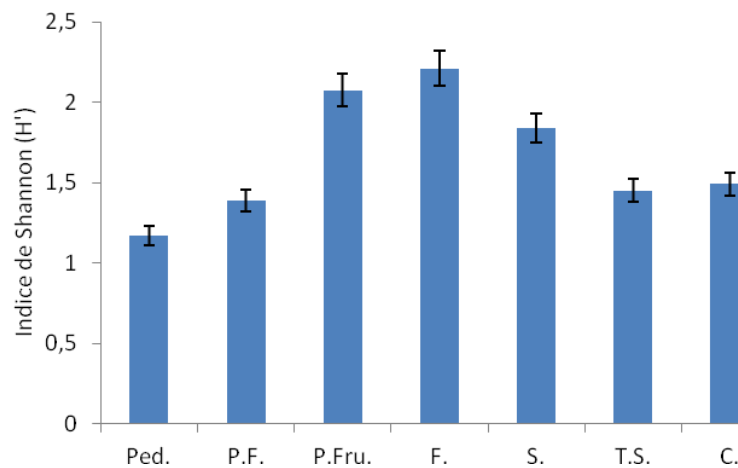


Figura 35. Se muestran los índices de diversidad calculados para los respectivos órganos inoculados de *E. uruguayensis*. Ped.: Pedicelos; P.F.: Primordio Flor; P.Fru.: Pedúnculo Fruto; F.: Fruto; S.F.: Sépalos Fruto; T.S.: Testa Semilla; C.: Cotiledones.

Las curvas de acumulación de especies (Figura 36) muestran el número de especies encontradas a medida que el esfuerzo de muestreo se aumentó en 10 segmentos inoculados.

El punto que permite alcanzar la asíntota varió en cada órgano. En pedúnculo de fruto, pedicelos de primordios florales y fruto esta fue alcanzada a los 80 segmentos, mientras que en sépalos de fruto la asíntota se alcanzó a los 60 segmentos (Figura 36a y 36b). Por otra parte en primordios florales la asíntota se alcanzó a los 20 segmentos (Figura 36b). Por último, en testa de semillas fue alcanzada a los 90 y en cotiledones la misma se alcanzó a los 70 segmentos inoculados (Figura 36c).

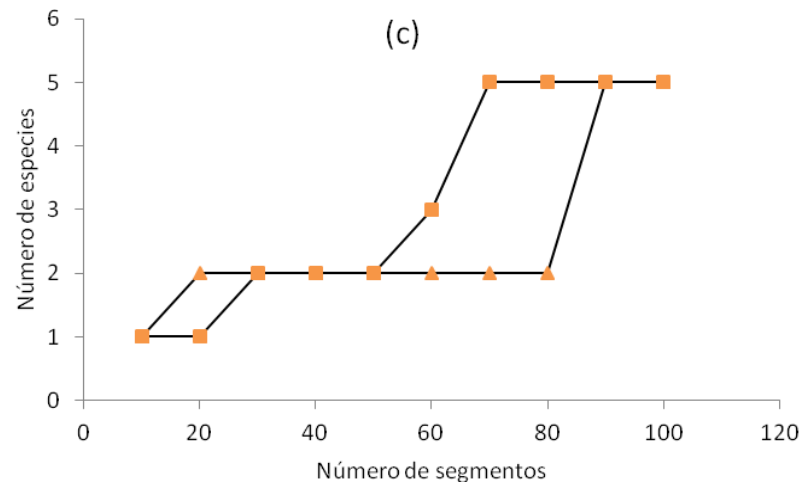
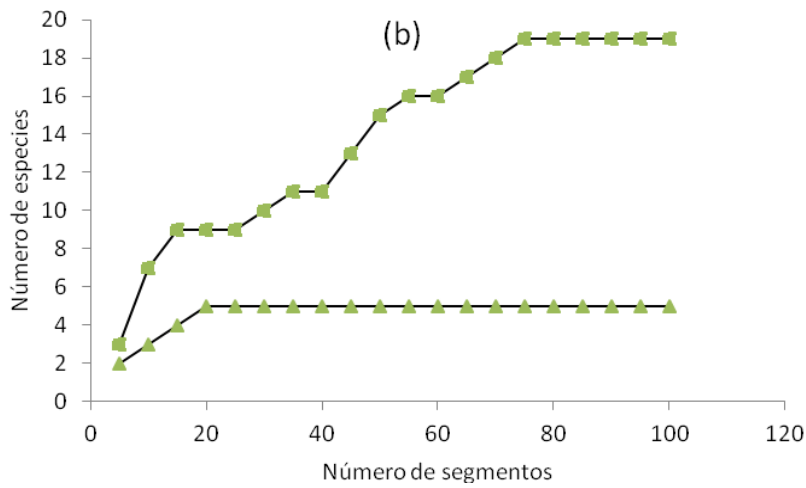
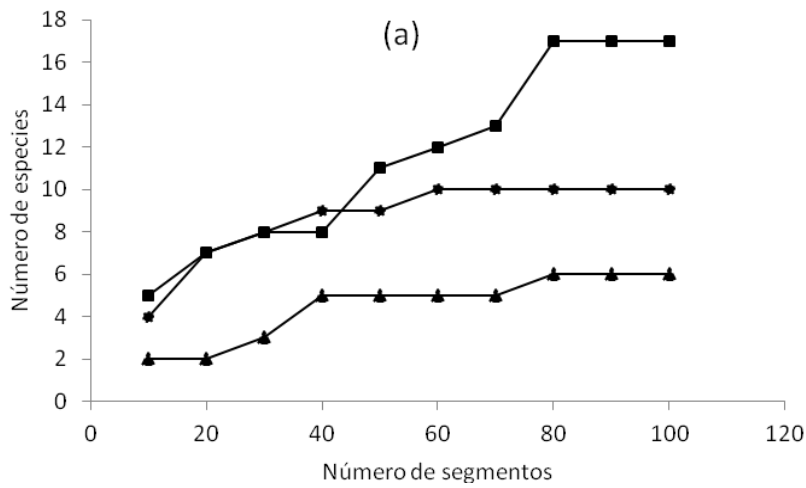


Figura 36. Curvas de acumulación de especies, donde se muestra el número de especies encontradas cada 10 segmentos inoculados. La figura (a) muestra la curva para: Pedúnculos de fruto (■); Sépalos de Fruto (●) y Pedicelos (▲). La figura (b) muestra la obtenida para: Fruto (■) y Primordio de Flor (▲). Por último la figura (c) muestra la curva de acumulación de especies para: Testa Semilla (▲); Cotiledones (■).

Por último, el análisis de correspondencias llevado a cabo en las 33 especies aisladas para flor (pedicelos + primordios florales), fruto (pedúnculo + fruto + sépalos) y semilla (testas + cotiledones), muestra que las dos primeras coordenadas de los ejes explican el 100% de la inercia, indicando así un excelente ajuste del modelo (Figura 37).

El eje 1 contribuye en un 60% al total de la inercia, separando el conjunto de hongos asociados a semilla de aquellos asociados a fruto. Mientras que el eje 2 contribuye en un 40% al total de la inercia, separando los hongos asociados a flor de aquellos asociados a fruto.

Las especies que contribuyen a la separación de la semilla con respecto al fruto son *Epicoccum purpurascens* (Epi), *Cladosporium cladosporioides* (Cla) y *Sordaria fimicola* (Sor), con una contribución del 25,54% a la inercia. Por otra parte las especies que contribuyen a la separación de la flor con respecto al fruto, son *Diplodia pinea* (Dip), *Colletotrichum phormii* (Cop) y *Gliocladium catenulatum* (Gli), con un 13, 21% de inercia. El fruto se compone de especies que contribuyen en su totalidad con un 23,14% a la inercia.

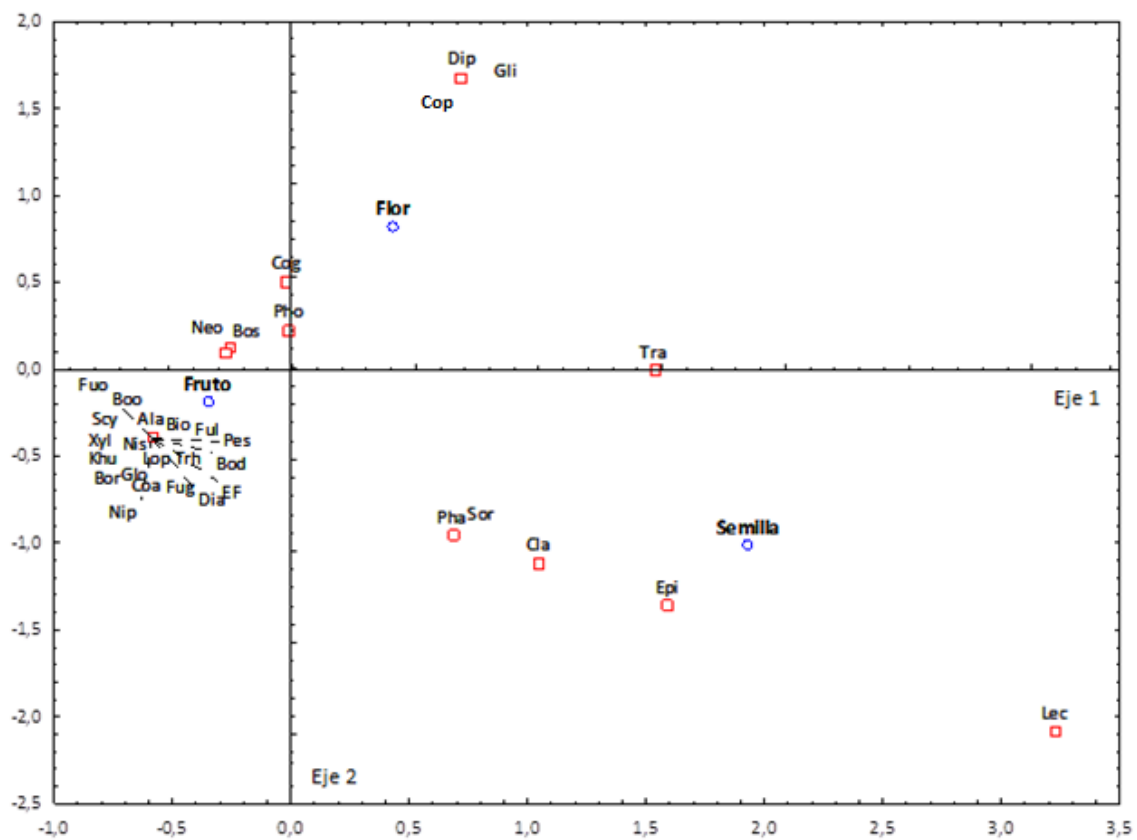


Figura 37. Análisis de correspondencias. Ordenamiento de los órganos inoculados acorde a la composición endofítica en los dos primeros ejes.

4.2. Identificación molecular.

Los análisis moleculares dieron resultados concordantes con las claves utilizadas en aquellos aislados donde el género o especie fue alcanzado a través de la utilización de estas.

De los 37 taxa aislados, 15 de ellos fueron clasificados como micelios estériles, los cuales fueron: 9^B, 17, 22, 23, 23^A, 27, 32, 33, 51, 57, 96, 99', 101, 116 y 129. El cuadro 2 muestra el resultado de los análisis de BLAST realizados a las mismas para así llegar a género o especie.

Por último a los aislados pertenecientes al género *Phomopsis* spp. se los agrupó en 6 morfotipos distintos (Morfotipo A, B, C, D, E y F) en base a características macromorfológicas (Figura 38). A cada Morfotipo se le amplificó la región ITS1 – 5.8S – ITS2 para establecer relaciones filogenéticas entre los mismos.

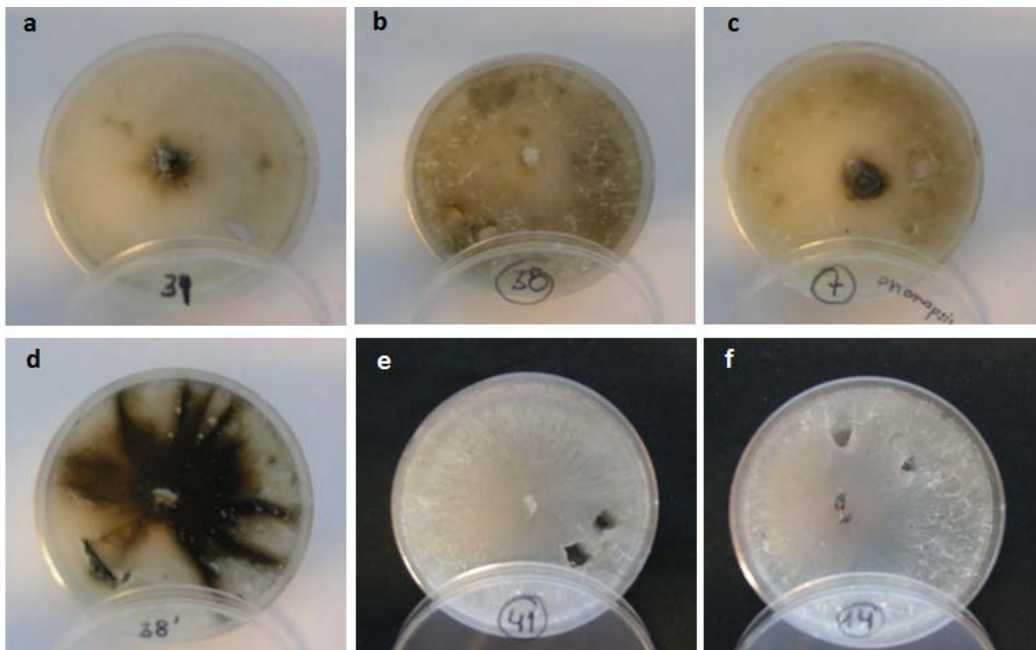


Figura 38. Se muestra los seis morfotipos de *Phomopsis* spp. que se obtuvieron en base a características macromorfológicas (tinción del medio, tipo de micelio, etc.).

La figura 39 muestra una de las dos electroforesis realizadas para confirmar los productos de amplificación de la región ITS1 – 5.8S – ITS2. Esta figura permite ver que el tamaño de banda se corresponde con el esperado de 600bp aproximadamente. En la misma también se muestra los productos de amplificación de los 6 morfotipos de *Phomopsis* spp.

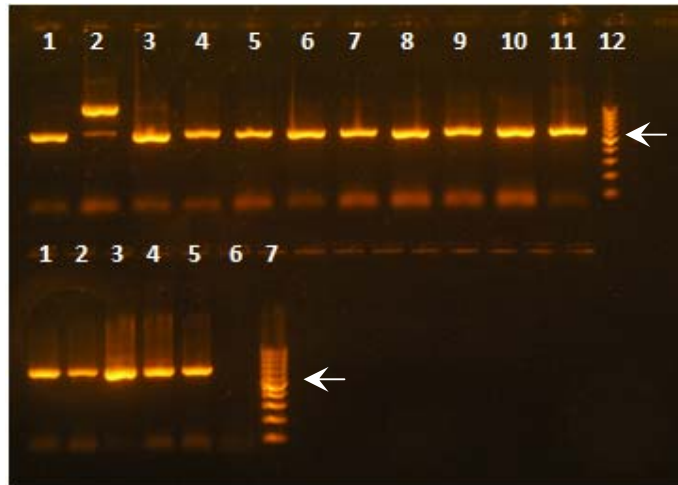


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Las flechas indican el peso molecular de las bandas amplificadas (600 pb aproximadamente). Carriles superiores: carril 1: cepa 9^B; carril 2: cepa 17; carril 3: cepa 22, carril 4: cepa 23; carril 5: cepa 23^A; carril 6: cepa 27; carril 7: cepa 32; carril 8: cepa 33; carril 9: cepa 51; carril 10: *Phomopsis* spp. MF A; carril 11: *Phomopsis* spp. MF B; carril 12: Marcador de Peso Molecular. Carriles inferiores: carril 1: *Phomopsis* spp. MF C; carril 2: *Phomopsis* spp. MF D; carril 3: *Phomopsis* spp. MF E; carril 4: *Phomopsis* spp. MF F; carril 5: control positivo; carril 6: control negativo; carril 7: Marcador Molecular.

NOTA: el carril 2 (cepa 17) muestra 2 bandas, producto de esto, se extrajo nuevamente el ADN del cultivo puro y se amplificó de nuevo la región específica (no se muestra).

Cuadro 2. Se muestra el resultado de los análisis de BLAST realizados a las secuencias de las cepas que fueron clasificadas como micelios estériles.

Cepa	Resultado BLAST	Cepa	Resultado BLAST
9 ^B	<i>Xylaria venosula</i>	51	<i>Fusarium oxysporum</i>
17	<i>Lophiostoma</i> sp.	57	Endófito fúngico (Ascomycete)
22	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	96	<i>Botryosphaeria ribis</i>
23	<i>Botryosphaeria obtusa</i>	99'	<i>Bionectria ochroleuca</i>
23 ^A	<i>Xylaria venosula</i>	101	<i>Botryosphaeria stevensii</i>
27	<i>Phomopsis</i> spp.	116	<i>Colletotrichum phormii</i>
32	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	129	<i>Lecanicillium lecanii</i>
33	<i>Diaporthe phaseolorum</i>		

4.3. Análisis filogenético de *Phomopsis* spp.

El resultado del análisis filogenético por Máxima Parsimonia agrupó a los seis morfotipos de *Phomopsis* spp. en un gran clado cuyo valor de bootstrap fue de 94%, conteniendo a los morfotipos A, E, F y B. Por otra parte los morfotipos D y C, fueron agrupados en un grupo terminal con un valor del 100%, lo que estaría sugiriendo un origen común (Figura 40).

Dentro del clado mayor tenemos un subclado (Morfotipos A, E y F) cuyo nodo adquiere un valor del 50%, y a su vez dentro de este, encontramos un grupo terminal con un valor de Bootstrap del 87% entre los morfotipos A y E. Esto último estaría indicando una alta similitud entre los mismos. Como grupo externo se utilizó el Ascomycete *Botryosphaeria dothidea*, cuya secuencia fue extraída de la base de datos del GenBank (AB454278.1).

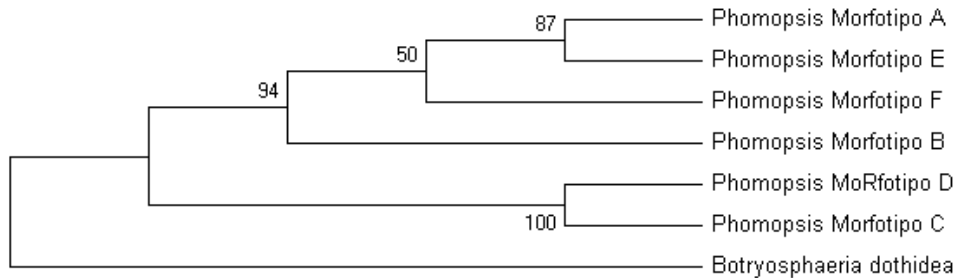


Figura 40. Análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia. La historia evolutiva fue inferida a través de la utilización del método de Máxima Parsimonia basado en el modelo de Tamura – Nei. El árbol con el mayor valor de log de Máxima Parsimonia (1682.4211) es el mostrado. El porcentaje que asocia a los taxa en clados juntos se muestra para cada clado formado al inicio de cada rama. Los análisis fueron realizados con el software MEGA 5.0.

4.4. Estudio enzimático

La evaluación enzimática mostró que de los hongos endófitos asociados a estructuras reproductivas de *E. uruguayensis* el 82% produjo enzimas celulolíticas, un 15% produjo enzimas pectinolíticas y un 3% enzimas de tipo lignolíticas (Tabla 3).

De los seis morfotipos de *Phomopsis* spp. evaluados, todos produjeron celulasas mientras que solo uno de ellos (Morfotipo A) produjo pectinasas. Ninguno de los 6 produjo enzimas lignolíticas.

Por último las dos únicas cepas de hongos que produjeron enzimas del tipo lignolíticas fueron aquellos pertenecientes a los géneros *Phaeoconiella* y *Gliocladium*. El primero exhibiendo actividad con los tres sistemas enzimáticos evaluados, mientras que el segundo restringido solo a enzimas involucradas en la degradación de lignina.

Todos los controles utilizados dieron positivo a los tres sistemas enzimáticos evaluados. La figura 38 muestra a modo de ejemplo los halos de clareado generados en los tres medios de cultivos utilizados.

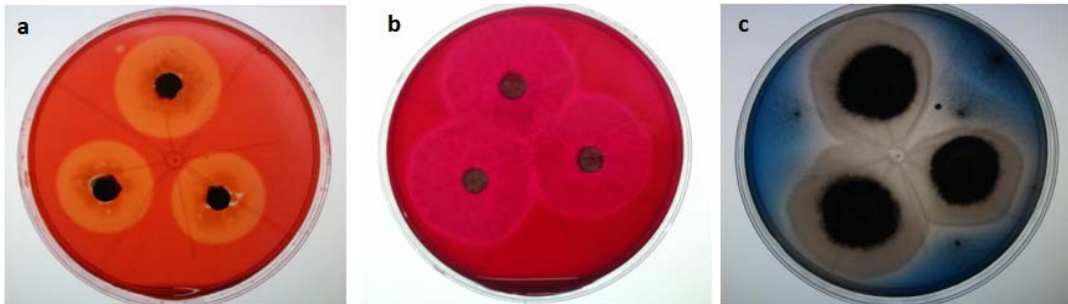


Figura 38. Resultado de la evaluación enzimática. En (a) se observa el halo de clareado como resultado de la actividad celulasa de *Phaeoconiella* sp. En (b) se muestra el resultado de la actividad pectinasa obtenida de *Phomopsis* spp. Morfotipo A. En (c) se observa el resultado de la actividad ligninasa para *Gliocladium catenulatum*.

Tabla 2. Evaluación de la producción de enzimas celulasas, pectinasas y ligninasas en todos los aislados obtenidos de *Eugenia uruguayensis*. H.M.: Halo micelial; H.C.: Halo clareado; A.E.: Actividad enzimática.

Colonia	Evaluación Enzimática								
	Celulasa (cm)			Pectinasa (cm)			Ligninasa (cm)		
	H.M.	H.C.	A.E.	H.M.	H.C.	A.E.	H.M.	H.C.	A.E.
<i>Alternaria alternata</i> (8)	1,47	2,03	1,38	2,37	-	-	3,63	-	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i> (11)	4,77	4,93	1,03	4,13	-	-	3,83	-	-
<i>Botryosphaeria obtusa</i> (23)	4,30	4,30	1,00	2,83	-	-	4,07	-	-
<i>Bionectria ochroleuca</i> (99')	1,30	1,43	1,10	2,70	-	-	3,73	-	-
<i>Botryosphaeria ribis</i> (96)	2,40	2,40	1,00	4,10	-	-	4,00	-	-
<i>Botryosphaeria stevensii</i> (101)	2,27	-	-	3,60	-	-	3,23	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (34)	1,43	2,90	2,03	1,53	2,13	1,391	1,30	-	-
<i>Colletotrichum acutatum</i> (16')	1,67	2,10	1,26	1,93	1,93	1	3,93	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (13')	1,57	1,57	1,00	1,83	-	-	3,00	-	-
<i>Colletotrichum phormii</i> (116)	1,73	2,10	1,21	3,17	-	-	3,80	-	-
<i>Diaporthe phaseolorum</i> (33)	1,93	1,93	1,00	2,87	-	-	3,80	-	-
<i>Diplodia pinea</i> (114)	1,73	1,73	1,00	1,93	-	-	3,83	-	-
Endófito fúngico (Ascomycete) (57)	3,23	3,93	1,22	2,40	-	-	1,97	-	-
<i>Epicoccum purpurascens</i> (130 ^A)	1,70	1,70	1,00	2,40	-	-	3,37	-	-
<i>Fusarium graminearum</i> (12)	2,90	3,67	1,27	1,83	-	-	3,33	-	-
<i>Fusarium lateritium</i> (8 ^A)	1,43	1,43	1,00	1,83	-	-	2,53	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (51)	1,47	1,47	1,00	1,57	-	-	3,57	-	-
<i>Gliocladium catenulatum</i> (119)	1,00	-	-	1,00	-	-	4,13	4,27	+
<i>Glomerella cingulata</i> (30)	1,67	2,07	1,24	3,43	-	-	3,07	-	-
<i>khushia oryzae</i> (14')	3,20	4,60	1,44	2,40	-	-	3,77	-	-
<i>Lecanicillium lecanii</i> (129)	2,37	3,57	1,51	2,37	2,57	1,085	3,57	-	-
<i>Lophiostoma</i> sp. (17)	1,20	-	-	1,40	-	-	3,30	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i> (5)	2,77	2,77	1,00	4,53	-	-	4,07	-	-
<i>Nigrospora sacchari</i> (18)	2,57	2,57	1,00	2,77	-	-	3,13	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i> (95 ^X)	3,53	4,07	1,15	3,47	1,73	0,5	3,13	-	-
<i>Pestalotiopsis guepini</i> (88)	3,60	3,60	1,00	2,23	-	-	3,80	-	-
<i>Phaeomonilla</i> sp. (74')	1,63	2,87	1,76	1,37	3,87	2,829	3,43	3,60	+
<i>Phomopsis</i> spp. (39) Morfotipo A	2,80	3,27	1,17	3,43	2,10	0,612	4,00	-	-
<i>Phomopsis</i> spp. (26) Morfotipo B	3,33	3,63	1,09	3,67	-	-	3,70	-	-
<i>Phomopsis</i> spp. (7) Morfotipo C	2,17	2,57	1,18	1,80	-	-	3,70	-	-
<i>Phomopsis</i> spp. (15) Morfotipo D	1,97	1,97	1,00	3,03	-	-	3,67	-	-
<i>Phomopsis</i> spp. (41) Morfotipo E	2,17	2,17	1,00	4,07	-	-	4,00	-	-
<i>Phomopsis</i> spp. (14) Morfotipo F	2,47	2,97	1,20	4,57	-	-	2,23	-	-
<i>Phomopsis</i> spp. (1) Morfotipo G	1,50	-	-	3,67	-	-	3,70	-	-
<i>Sordaria fimicola</i> (95 ^B)	2,07	2,07	1,00	2,57	-	-	3,60	-	-
<i>Scytalidium</i> (88 ^A)	1,77	-	-	4,43	-	-	3,77	-	-
<i>Trichoderma atroviride</i> (42)	3,10	3,63	1,17	2,50	-	-	4,00	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> (94)	4,60	4,60	1,00	2,57	-	-	4,00	-	-
<i>Xylaria venosula</i> (9 ^B)	1,50	1,50	1,00	2,40	-	-	2,97	-	-

4.5. Evaluación de Metabolitos bioactivos

Un total de 19 aislamientos fueron seleccionados para la extracción de metabolitos secundarios con bioactividad. De los cuales solo 5 presentaron al menos inhibición frente a uno de los patógenos bacterianos (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), a su vez, de estos 5, solo uno tuvo la capacidad de inhibir a uno de los hongos patogénicos utilizados (*Candida albicans*). Los metabolitos de los aislados que generaron halos de inhibición frente a bacterias patógenas se correspondieron con: *Alternaria alternata*, *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium graminearum*, *Lophiostoma* sp. y *Trichoderma atroviride*. De estos cinco, el único que generó halo de inhibición frente a hongos patogénicos fue *F. graminearum* (Tabla 4).

De los seis morfotipos de *Phomopsis* spp. que fueron evaluados para la producción de metabolitos bioactivos, ninguno generó halo de inhibición (Tabla 4).

La figura 39 muestra el halo de inhibición generado por los metabolitos extraídos de *Alternaria alternata*.



Figura 39. Se observa el halo de inhibición generado por los metabolitos extraídos de *Alternaria alternata* sobre *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los metabolitos bioactivos frente a bacterias patógenas de humanos y plantas. Medidas del diámetro del halo de inhibición tomadas en mm. Como control negativo se utilizó acetona, mientras que como controles positivos: el antibiótico ampicilina (en el caso de las bacterias) y el antifúngico benlate (en el caso de los hongos). Para los hongos patogénicos se utilizaron cultivos monospóricos con una concentración de esporas de 10^6 en todos los casos, las cuales fueron contadas con cámara de Neubauer. E.c.: *Escherichia coli*; S.a.: *Staphylococcus aureus*; X.c.: *Xanthomonas campestris*; Er.c.: *Erwinia carotovora*; C.a.: *Candida albicans*; C.g.: *Colletotrichum gloeosporioides*; A.f.: *Aspergillus fumigatus*; F.o.: *Fusarium oxysporum*.

Metabolitos fúngicos	Bacterias patógenas				Hongos patogénicos			
	E. c.	S. a.	X. c.	Er. c.	C. a.	C. g.	A. f.	F. o.
<i>Neofusicoccum parvum</i>	-	+ (10)	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	+ (10)	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum acutatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Epicoccum purpurascens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	-	+ (10)	-	-	+ (10)	-	-	-
<i>Gliocladium catenulatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lophiostoma</i> sp.	+ (2)	+ (2)	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp. Morfotipo A	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp. Morfotipo B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp. Morfotipo C	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp. Morfotipo D	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp. Morfotipo E	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp. Morfotipo F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scytalidium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma atroviride</i>	-	+ (20)	-	-	-	-	-	-
Control negativo (acetona)	-	-	-	-	-	-	-	-
Control positivo - ampicilina 0,2 g/ml	+ (15)	+ (37)	+ (15)	+ (29)	-	-	-	-
Control positivo – benlate 0.66 g/ml	-	-	-	-	-	-	-	-

5. Discusión

Aislamiento e identificación de la comunidad endofítica

El procedimiento de esterilización superficial realizado fue efectivo debido a la ausencia de crecimiento en el medio donde se realizaron las impresiones. Esto nos permite concluir que todos los hongos aislados son endófitos.

Por otra parte, la comunidad endofítica asociada a las estructuras reproductivas de *E. uruguayensis*, resultó ser similar a la de otras Myrtaceae nativas previamente estudiadas por Bettucci y colaboradores (2004).

A su vez todos los hongos aislados en este estudio ya han sido reportados como endófitos de otras plantas (Lupo *et al.* 2001; Bettucci *et al.* 2004; Promputtha *et al.* 2007; Rakotoniriana *et al.* 2008; Urdaneta *et al.* 2009).

Los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos por Rakotoniriana y colaboradores (2008), donde aislaron 45 taxa, y todos ellos pertenecieron al phylum Ascomycota, confirmando lo propuesto por Petrini (1986), de que la inmensa mayoría de hongos endófitos pertenecen a este phylum. La ausencia de Basidiomycetes descomponedores de madera en esta investigación también se condice con lo hallado por Bettucci y colaboradores (2004), en otras Myrtaceae nativas.

Del total de especies aisladas, un 36% de estas han sido citadas como saprofitas, un 40% como especies potencialmente patógenas y 20% como saprofitas y patógenas a la vez. Debido a que los hongos fueron aislados de órganos y tejidos sanos (sin síntomas) decimos que estamos frente a saprótrofos y patógenos latentes. Por último un 4% de los aislados son considerados como endófitos en el sentido estricto del término debido a que a la fecha no existen reportes del comportamiento de estos como saprofitos o patógenos.

Algunas de las especies aisladas corresponden a importantes patógenos que podrían generar pérdidas en cultivos, como: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium lateritium* y *Phomopsis* spp., entre otras (Martin & García-Figueres, 1999; Moster *et al.* 2000; Karaca & Erper, 2001). Esto sugiere que podamos considerarlas como patógenos potenciales del guayabo blanco.

El alto porcentaje de endófitos asociados a las estructuras reproductivas, que son citados como patógenos, no implica que estos, dentro de los tejidos de la planta deban

de comportarse como tal. Ya que según Schulz & Boyle (2005), se ha visto que la patogenicidad podría depender de un único gen. Por ejemplo, una simple mutación puede causar que un patógeno como *Colletotrichum magna* se convierta en un endófito mutualista (Freeman & Rodriguez, 1993).

Por otra parte Mostert y colaboradores (2000), aislaron de raíces de *Vitis vinífera*, *Phomopsis viticola* (considerado un patógeno de los cultivos de vid) y otra especie de *Phomopsis* no identificada. La inoculación de ambas en tejidos sanos de *V. vinífera* resultó en síntomas causados solamente por *P. viticola*, pero no por *Phomopsis* sp. Esto permitió concluir que la primera especie se comportó como patógeno latente pero la segunda estaba adaptada a crecer de forma endófito.

Por último se destaca el aislamiento de especies consideradas antagonistas de patógenos vegetales, como lo son: *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum* (Prokkola & Kivijarvi, 2007).

El resultado del análisis filogenético entre los aislados pertenecientes al género *Phomopsis* spp. hace pensar en la existencia de 4 especies y no en 6 como se propuso en un principio en base a características macromorfológicas. Según Santos y colaboradores (2010), para una mejor confirmación de esto habría que amplificar otras regiones del genoma con mayor cantidad de sitios informativos como por ejemplo el factor de elongación.

Por otra parte, la extensa bibliografía que cita a especies de este género como patógenos importantes de determinados cultivos y así como también la alta frecuencia observada en estructuras reproductivas de *E. uruguayensis*, abre la puerta a estudios filogenéticos futuros que permitan comparar estas con otras especies, patógenas o no, aisladas en Uruguay.

En cuanto a la diversidad encontrada, el elevado número de especies halladas en fruto comparado con el hallado en primordios florales, puede deberse a un mayor tiempo de exposición al ambiente por parte de los frutos. Así como también a cambios fisiológicos observados en este órgano (aumento en la concentración de azúcares por ejemplo) que promueven un mejor desarrollo y a su vez un establecimiento más rico de endosimbiontes fúngicos como lo postula Bravo y colaboradores (2005).

Por otra parte Urdaneta y colaboradores (2009), plantean que la alta diversidad también puede deberse al ingreso del inoculo durante la antesis de la flor, lo que se relacionaría con el bajo índice de diversidad hallado en primordios florales (previo a la antesis).

También vemos que la diversidad observada en pedúnculos de fruto es superior a la observada en pedicelos. Ambos son el mismo órgano, pero con funciones distintas en distintos estadios del desarrollo. Uno sostiene la estructura reproductiva (flor) y el otro la estructura de diseminación (frutos con semillas). Las diferencias observadas a nivel de diversidad pueden deberse también a una mayor exposición de los pedúnculos en comparación con los pedicelos. Otra explicación posible según Schulz & Boyle (2005), es la preferencia que tienen ciertos endófitos por un determinado órgano en particular. Por ejemplo, *Melanconium apiocarpum* y *Cryptosporiosis* sp. en *Alnus* spp., tienden a estar conferidos a la corteza. Por otra parte *Pestalotiopsis cruenta* y *Phomopsis* spp. tienden a ser encontradas en el xilema y corteza de ramitas de *Tripterygium wilfordii*, pero no en raíces y hojas (Kumar & Hyde, 2004).

Los índices de diversidad obtenidos para las testas de las semillas y los cotiledones son muy parecidos. Según Arnold y colaboradores 2003, los endófitos asociados a plantas leñosas son raramente hallados en testas de semillas.

Una explicación plausible a esto es la presencia de una porosidad particular en la testa de las semillas inoculadas, que habría permitido el ingreso del inóculo.

Si comparamos las especies aisladas de órganos reproductivos (primordios y frutos) y vegetativos (pedicelos y pedúnculos), vemos que entre estos hay especies compartidas (la mayoría). Es el caso por ejemplo de: *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Phaeomoniella* sp., *Phomopsis* spp., *Trichoderma atroviride*, *Sordaria fimicola*, entre otras. Según la clasificación propuesta por Rodríguez y colaboradores (2008), los endófitos no-clavicipetaceos de la clase 3 no se transmiten verticalmente, por lo que en el caso de aislar endófitos de tejidos reproductivos, los mismos tendrían que haber sido distintos a los aislados en pedúnculos y pedicelos.

Aunque Morales-Rondón & Rodríguez (2009), en un estudio sobre ramas, hojas, inflorescencias y frutos (pre y post-cosecha) de mango “Haden” (*Mangifera indica*) llegaron a resultados similares a los obtenidos en este trabajo en cuanto a la transmisión observada. Ya que aislaron como endófitos de órganos vegetativos y

reproductivos, a especies como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium decemcellulare*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. y *Cladosporium* sp.

Las curvas de acumulación de especies se tornan asintóticas cuando todas las especies asociadas a un determinado órgano vegetal han sido colectadas (Arnold *et al.* 2000). Las comunidades en sí, se componen de especies comunes (las primeras en aparecer) y especies raras (últimas en aparecer), siendo estas últimas las causantes de curvas no asintóticas según Neubert y colaboradores (2006).

Zabalgogea (2008), propone que estas curvas en realidad nunca se tornan asintóticas, sugiriendo que si más plantas o segmentos (en este caso), hubieran sido muestreados, el número de especies aisladas aumentaría sustancialmente.

Lo hallado en este trabajo en parte se contradice con lo propuesto por Zabalgogea (2008), ya que es claramente visible curvas asintóticas en pedicelos, primordios florales, pedúnculos de fruto, frutos, sépalos y cotiledones. Por lo que los resultados estarían indicando que el muestreo fue satisfactorio.

En cuanto a la curva de acumulación de especies para las testas de las semillas vemos que esta no asintotiza, esto indica que se debería de aumentar el esfuerzo de muestreo. Visto de otra manera, en este caso lo propuesto por Zabalgogea, 2008 cobraría fuerza.

Producción de enzimas extracelulares

El análisis de los tres sistemas enzimáticos evaluados permite concluir que la mayoría de los endófitos aislados degrada celulosa, en segundo lugar pectina y en tercer lugar lignina.

La proporción de organismos productores de celulasas y ligninasas dio resultados concordantes con los obtenidos por Choi y colaboradores (2005), donde de un total de 21 especies endófitas asociadas a *Brucea javanica*, la mayoría tuvo la capacidad de degradar celulosa y un número mínimo de especies, lignina.

La baja proporción de organismos productores de enzimas lignolíticas se debe a que la actividad ligninasa está restringida a un rango estrecho de hongos. Siendo encontrada comúnmente en Basidiomicetes, particularmente en aquellos que generan podredumbre blanca (Rojas *et al.* 2010). Y como ya se discutió anteriormente, la

comunidad endofítica de *E. uruguayensis*, es representada en su totalidad por el phylum Ascomycota.

La evaluación de las pectinasas, dio resultados opuestos a los obtenidos por Choi y colaboradores (2005). Esto puede ser entendido por lo siguiente: estos investigadores trabajan con estructuras vegetativas, y la composición de estas no es tan rica en pectina, mientras que las paredes de los frutos representan todo lo contrario (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

Además, si tomamos como el 100% a las especies catalogadas exclusivamente como patógenos latentes, vemos que un 60% de las mismas se encuentran en fruto. Según Reddy y colaboradores (1997), los microorganismos que se comportan como parásitos débiles o patógenos latentes tienden a una alta producción de proteinasas y pectinasas.

Concluyendo, según Carroll & Petrini (1983), el conocimiento sobre los patrones de utilización de los sustratos vegetales por parte de los hongos, así como también el saber que enzimas producen estos, nos permitirá entender el rol funcional de los endófitos.

Metabolitos bioactivos

El resultado de antibiograma realizado a los aislados seleccionados, permite ver que los hongos endófitos asociados a *E. uruguayensis*, representan una fuente potencial de metabolitos con acción antimicrobiana.

Aunque solo un 29% de los metabolitos analizados arrojó resultados positivos al menos contra uno de los patógenos testeados, no significa que el 71% restante, no tenga algún tipo de actividad. Ya que lo único evaluado en este trabajo, fue la capacidad antibacteriana y antifúngica de los mismos. Pero existen otros tipos de actividades exhibidas por los endófitos que no fueron testeadas, como por ejemplo: actividades herbicidas, alguicidas (Schulz *et al.* 2002), actividades antitumorales, inmunosupresoras, antioxidantes, citotóxicas, nematocidas, entre otras (Osmanova *et al.* 2009; Brakhage & Schroeckh, 2011). A esto se le suma también que el número de cepas evaluadas es relativamente pequeño comparado con el número de aislados obtenidos.

En cuanto a las especies que sí dieron positivo, *Alternaria alternata*, ya ha sido reportada como productor potencial de compuestos con bioactividad. Por ejemplo, Ramírez y colaboradores (2006), hallaron dos cepas endófitas de *Alternaria* sp. con acción antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Por otra parte Ma y colaboradores (2009), obtuvieron de esta misma especie (asociada como endófito de *Maytenus hookeri*), compuestos como alternariol, alternariol monometil éter, uridina, adenosina, altertoxina, entre otros. Es sabido que algunos de estos compuestos exhiben actividades antifúngicas y fitotóxicas (Davis & Stack, 1994).

Neofusicoccum parvum, es citado en muchas investigaciones como endófito de plantas leñosas, manifestando alta diversidad en estas. Pero considerado como patógeno potencial de ciertos cultivos (Slippers & Wingfield, 2007). Esta patogenicidad puede deberse a la producción de compuestos con cierta toxicidad. La cepa evaluada en este trabajo permite concluir que algunos de estos metabolitos pueden resultar útiles para el control de bacterias patógenas.

Fusarium graminearum, resultó ser la única cepa evaluada que produjo metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de al menos un patógeno fúngico (*Candida albicans*) y uno bacteriano (*Staphylococcus aureus*) a la vez. Esto puede tener una explicación plausible y es que este género es citado como productor de un amplio espectro de metabolitos secundarios, producto de las diferentes y variables vías metabólicas que posee. Por ejemplo, la ruta isoprenoide (ej. tricotecenos), ensamblajes de poliketidos (ej. zearaleonona y fumonisinas) y mediante amino ácidos (ej. butenolidos y eniantinas) (Apsimon *et al.* 1994).

El género *Lophiostoma*, ya ha sido citado como productor potencial de compuestos con bioactividad. La cepa aislada en este trabajo fue la única capaz de inhibir el crecimiento de una enterobacteria (*E. coli*). Según Miao & Qian (2005), el resultado del análisis antibacterial contra 19 patógenos de una cepa de *Lophiostoma* sp., dio una actividad moderada frente a los mismos: entre 5 y 20mm de halo de inhibición generado por los metabolitos de éste.

Por último, *Trichoderma atroviride* representa un género que es extensamente utilizado para controlar patógenos como *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros. Las especies de este género actúan como

micoparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas (Perdomo *et al.* 2007). El desplazamiento del patógeno puede darse a través de: competencia directa, producción de metabolitos (volátiles o no) o micoparasitismo (Harman, 2000). En base a esto, la ausencia de inhibición observada sobre los patógenos fúngicos, puede deberse a que la cepa testeada no produce metabolitos eficientes contra las cepas fúngicas estudiadas, pero podría utilizar como mecanismo antagonista frente a hongos patogénicos la competencia directa y no la producción de metabolitos.

Por otra parte, estos sí resultaron eficaces frente a *Staphylococcus aureus*. Algunos de los compuestos que la literatura cita con actividad antimicrobiana son: azapilonas, butenolidas, antraquinonas, metilanttraquinonas, harzianolidas, entre otras (Kubicek & Harman, 1998; Osmanova *et al.* 2009).

En síntesis, la ausencia de antagonismo, no significa que los metabolitos producidos por estas cepas, no tengan bioactividad, sino que los mismos no resultaron ser activos frente a los patógenos testeados y frente al tipo de actividad evaluada. Tal vez, frente a otros patógenos, otros tipos de actividades y en diferentes condiciones, si puedan resultar activos. Ya que como lo postula Hertweck (2009), mucho de los genes involucrados en el metabolismo secundario pueden silenciarse en condiciones estandarizadas de laboratorio.

6. Conclusiones y Perspectivas

La composición de la comunidad endofítica de *E. uruguayensis* es similar a la de otras Myrtaceae nativas estudiadas. El número de taxa obtenidos de los tejidos inoculados es elevado y está compuesto fundamentalmente por especies cosmopolitas.

Se encontraron especies fúngicas capaces de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos, confirmando que los hongos endófitos de las Myrtaceae nativas pueden ser una nueva fuente de metabolitos secundarios con bioactividad, ofreciendo una oportunidad para la obtención de nuevos medicamentos y agroquímicos.

Como estudios a futuro se hace énfasis en:

Una búsqueda más exhaustiva de metabolitos con acción antimicrobiana.

Un estudio más detallado de los tres sistemas enzimáticos asociados a cada órgano en particular, sumándole también a este estudio otras enzimas como por ejemplo xilanasas, mananasas, entre otras, que permitan sacar conclusiones más profundas sobre el rol ecológico de los endófitos en la degradación de los biopolímeros.

7. Bibliografía consultada

Alexander, M. 1967. Introduction to soil microbiology. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 197-215.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.

Appel, D.J., & Gordon, T.R., 1996. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 125-38.

ApSimon, J.W., Blackwell, B.A., Edwards, O.E., Fruchier, A., Miller, J.D., Savard, M. & Young, J.C., 1994. The chemistry of fumonisins and related compounds fumonisins from *Fusarium moniliforme* – chemistry, structure and biosynthesis. *Pure Appl Chem* 66:2315–2318.

Arechavaleta, M., Bacon, C.W., Hoveland, C.S. & Radcliffe, D.F., 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response in environmental stress. *Agronomy journal*. 81: 83-90.

Arnold, A.E. 2001. Fungal endophytes in neotropical trees: abundance, diversity, and ecological interactions. In: Ganeshiah KN, Uma Shaanker R, Bawa KS, eds. *Tropical ecosystems: structure, diversity, and human welfare*. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. 739–743.

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

Arnold, A.E., Mejia L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 100: 15649-15654.

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

Aro, N., Pakula, T. & Penttilä M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:719-739.

- Azcón-Bieto, J. & Talón, M., 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. Ed. Mc. Graw Hill.
- Bacon, C.W. & White, J.F., 2000. Microbial endophytes. Marcel Dekker, NY, 487.
- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K. A., Moen, M. A. & Hammel, K. E., 1994. Oxidation degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. FEBS Letters, 354, 297-300.
- Barengo, N., Sieber, T.N. & Holdenrieder, O., 2000. Diversity of endophytic mycobiota in leaves and twigs of pubescent hirsch (*Betula pubescens*). Sydowia. 52: 305-320.
- Baura G., Szaro T.M., & Bruns T.D., 1992. *Gastrospilus laricinus* is a recent derivatives of *Suillus grevillei*: molecular evidence. Mycologia, 84: 592-597.
- Bettucci, L., Simeto, S., Alonso, R. & Lupo, S., 2004. Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. Sydowia 56 (1): 8-23.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiototechnol. (Tokyo), 58: 1-26.
- Bischoff, J.F. & White, J.F., 2005. Evolutionary development of the Clavicipitaceae. The fungal community: In organization and role in the ecosystem. Boca raton. FL., USA: Taylor & Francis, 505-518.
- Blanco, P., Sieiro, C. & Villa, T.G., 1999. Production of pectic enzymes in yeast. FEMS Microbiology Letters, 175: 1-9.
- Bourbannais, R., Paice, M.G., Freiermuth B., Bodie, E. & Borneman S., 1997. Reactivities of various mediators and laccase with kraft pulp and lignin model compounds. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 12, p. 4627-4632.
- Brakhage, A.A., & Schroeckh, V. 2011. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. Fungal Genetics Biology, 48, 15–22.
- Bravo, V.; D. Rodriguez, M. Sanabria, M. Marín Larreal, R. Santos, E. Pérez & L. Sandoval. 2005. Momento de infección por *Dothiorella* sp. y aparición de síntomas de la pudrición apical del guayabo. Revisión Facultad Agronomía (LUZ), 22: 369-381.
- Bruns, T.D., White, T.J. & Talyor, J.W., 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 22: 525-564.

- Brussa, C. & Grela, I. 2007. Flora Arbórea del Uruguay. Con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Ediciones COFUSA, 458.
- Cardoso, C. & Sajo, M.D.G. 2004. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. *Revista Brasil Bot.*, 27 (1): 47-54.
- Carroll, G. C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: N. J. Fokema and J. Van den Heuvel (eds.), *Microbiology of the phyllosphere*, 205-222. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carroll, G. & Petrini, O., 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75: 53-63.
- Carroll, G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69 (1): 2-9.
- Choi, G.J., Rim, Y.W., Sung, B.R., Lim, Y.C., Kim, M.J., Kim, K.Y., Park, G.J., Park, N.G., Hong, Y.K. & Kim, S.R., 2005. Growth characters and productivity of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety "Hwasan 104". *J. Korean Grassl. Sci* 25(4): 275-280.
- Clay, K., 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 21: 275-297.
- Colwell R.K., Mao, C.X. & Chang, J. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence – based species accumulation curves. *Ecology*, 85: 2717-2727.
- Contreras, J.C., 2003. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Tesis Doctoral, Mayo 2003. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Cruickshank, R.H. & Wade, G.C., 1980. Detection of pectin enzymes in pectin acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 107: 177-181.
- Davis V.M. & Stack, M.E., 1994. Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (10): 3901–3902.
- Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S. & Shewale, J.G., 1988. Biologically active secondary metabolites from *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: 455-473.

- Dong, Y., Wang, L., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X. & Zhang L., 2001. Quenching quórum sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.
- Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H., 1994. Potential of fungi in discovery of novel low molecular weight pharmaceuticals. In: *The discovery of Natural Products with Therapeutic Potential* (ed. V.P. Gullo). Butterworth-Heinemann, London, UK: 49-80.
- Eggins, H.O.W. & Pugh, G.J.F., 1962. Isolation of cellulose decomposing fungi from soil. *Nature*, London 193: 94-95.
- Faeth, S.H. & Fagan, W.F., 2002. Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 360-368.
- Freeman, S. & Rodriguez, R. J. 1993. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260: 75-78.
- Gaitán, D.M. & Pérez, L.I., 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia, Bogotá. Enero 2007.
- Gamboa-Gaitán, M.A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Universidad Nacional de Colombia.
- Glenn, J.K. & Gold, M.H., 1983. Decolorization of several polymeric dyess by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1741-1747.
- Gonthier, P., Gennaro, M., & Nicolotti, G. 2006. Effects of wáter estress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity*, 21:69-80.
- Harman, G.E., 2000. Changes in perceptions derives from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. Publication N° D-2000-0208-01F.
- Hertweck, C., 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 48: 4688–4716.
- Heywood, V. H., 1967. *Modern Methods In Plant Taxonomy*. Academic Press. London.

- Higgins K.L., Arnold A.E., Miadlikowska J., Sarvate S.D. & Lutzoni F., 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 543–555.
- Hirsch, G.U. & Braun, U., 1992. Communities of parasitic microfungi. In: *Handbook of Vegetation Science*. Vol. 19. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands: 225-250.
- Hussain, H., Krohn, K., Draeger, S., Meier, K. & Schulz B., 2009. Bioactive Chemical Constituents of a Sterile Endophytic Fungus from *Melilotus dentatus*. *Records of Natural Products*, 3 (2): 114-117.
- Hyde, J.E., 2005. Drug-resistant malaria. *Trends in Parasitology*, 21: 495-498.
- Hyde, K.D. & Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.
- IPNI. 2010. The International Plant Names Index <http://www.ipni.org> [fecha de consulta: 13 de diciembre de 2010]
- Jayani, R.S., Saxena, S. & Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40: 2931-2944.
- Ji, Z.Q., Wu, W.J., Wang, M.A., Gu, A.G., 2005. Identification of fungicidal compounds from endophytic fungi *Fusarium proliferatum* in *Celastrus angulatus*. *Journal of Northwest Sci-Tech, University of Agriculture and Forest (Nat. Sci.Ed.)*. 33(5):61–4.
- Jolochin, G., 2008. Revisión de Myrtaceae Adans. de la flora uruguaya. Trabajo final de Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Tomo I y II.
- Jumpponen A. & Trappe J.M., 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist*, 140: 295–310.
- Karaca, H.G. & Erper, I., 2001. First report of *Pestalotiopsis guepini* causing twig blight on hazelnut and walnut in Turkey. *New Disease Reports*, Vol. 3. ISSN 2044-0588.
- Keller, N.P., & Hohn, T.M., 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics Biology*, 21: 17–29.

- Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M.H. & Wolfe, K.H., 2008. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genomic Biology* 9: R18.
- Korkama-Rajala, T., Müller, M.M. & Pennanen, T., 2008. Decomposition and Fungi of needle Litter from Slow- and Fast-growing Norway Spruce (*Picea abies*) Clones. *Microbial Ecology*, 56:76–89.
- Kubicek, C.P., & Harman, G.E., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Ed. Tylor & Francis, 1: 139-181.
- Kuldau, G. A. & Yates, I. E., 2000. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: Bacon .W., White J.F. (Eds.) *Microbial Endophytes*. Marcel dekker, Inc. New York-Basel.
- Kumar, D.S.S. & Hyde, K.D., 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17: 69-90.
- Kumaresan, V. & Suryanarayanan, T.S., 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*, 105: 1388–1391.
- Laura, J. & Castellanos, P., 2009. Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Revista peruana de biología*, 16(1): 125- 128.
- Lee, S.B., & J.W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287 in M. A. INNIS, D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, and T. J. WHITE, eds. *PCR protocols*. Academic Press, San Diego.
- Leuchtman, A., 1992. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins*, 1: 150-162.
- Lupo, S., Tiscornia, S. & Bettucci, L., 2001. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globules*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18: 38-41.
- Ma, Y-T., Qiao, L-R., , W-Q., Zhang, A-L. & Gao, J-M., 2009. Metabolites produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (3): 504-506.

- Malinowski, D.P. & Belesky, D.P., 2000. Adaptation of endophyte-infected cool season grasses to environmental stresses: mechanism of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40: 923-940.
- Martín, M.P. & García-Figueres, F., 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C.gloesporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology*. 105 (8): 733-741.
- Martinez, A.T., 2002. Molecular Biology and Structure - Function of Lignin Degradation Heme-peroxidases. *Enzyme and Microbiology Technology*, 30: 425-444.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E. & Folch-Mallol, J.L., 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50 (2 – 3): 119-131.
- Miao, L. & Qian, P-Y., 2005. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong. *Aquatic Microbial Ecology*, 38: 231–238.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 266-277.
- Moore, K. & H. Jung, H., 2001. Lignin and fiber digestion. *Journal of range management* 54:420-430.
- Morales-Rondón, V. & Rodríguez, M., 2009. Micobiota endofítica asociada al cultivo del mango 'Haden' (*Mangifera indica* L.) en el oriente de Venezuela. *Revista UDO Agrícola* 9 (2): 393-402. 2009.
- Mostert, L., Crous, P.W. & Petrini, O., 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52: 46-58.
- Mouso, N., Papinutti, L. & Forchiassin, F., 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 176-178.

- Murali, T.S., Suryanarayanan, T.S. & Venkatesan, g., 2007. Fungal endophyte communities in two tropical forest of southern India: diversity and host affiliation. *Mycological Progress*, 6: 191-199.
- Neubert, M., Herold, H. & Meinel, G. 2006. Evaluation of Remote Sensing image Segmentation Quality – Further Results and concepts. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*.
- Olvera, P. 2003. Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación. Tesis profesional presentada para obtener el título en maestría en biotecnología. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla-México.
- Ortiz, M.L., 2009. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia* 13(2):137-144.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer J., Baeza, J. & Rodríguez, J., 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57: 129–135.
- Osmanova, N., Schultze, W. & Ayoub, N., 2009. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews* 9 (2): 315-342.
- Osono, T., 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology*, 52:701–716.
- Papinutti, V.L., Diorio, L.A. & Forchiassin, F., 2003. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 16-20.
- Perdomo M., Peña, J., Guédez, C., Castillo, C. & Cásales, L., 2007. *Trichoderma harzianum* in the control of “Sancocho” disease in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Academia*, VI (12): 52-61.
- Pérez, J., & Jeffries, T.W. 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2402–2409.

Petrini, O., 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. Fokkema NJ, Van den Heuvel J (eds) Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge University Press, Cambridge, 175–187.

Petrini, O., 1991. Fungal endophytes of tree leaves. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer Verlag, 179-197.

Prada, H., Ávila, L., Sierra, R., Bernaly, A. & Restrepo, S. 2009. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endófito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. Revista Iberoamericana de Micología, 26(3):198–201.

Prokkola, S. & Kivijarvi, P., 2007. Effect of biological spray on the incidence of grey mould, fruit yield and fruit quality in organic strawberry production. Agricultural and food science, 16: 25-33.

Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., Hugel, E., McKenzie, C., Hyde, K. & Jeewon, R., 2007. A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. Microbial Ecology, 53: 579–590.

Ramírez R. J., Ernesto Delgado, E., Rodolfi, M. & Solveig, T., 2006. Actividad antagonica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Boletín Micológico, 21: 49-53.

Rakotoniriana, E.F., Munaut, F., Decock, C., Randriamampionona, D., Andriambololoniaina, M., Rakotomalala, T., Rakotonirina, E.J., Rabemanantsoa, C., Cheuk, K., Ratsimamanga, S.U., Mahillon, J., El-Jaziri, M., Quetin-Leclercq, J. & Corbisier, A.M. 2008. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. Antonie van Leeuwenhoek, 93: 27-36.

Ramírez, R., Yandry, J., Delgado Fernandez, E., Rodolfi, M. & Solveig, T., 2006. Antagonic activity of endophytic fungi from medicinal plants of Ecuador on pathogenic bacteria. Boletín Micológico, 21: 49-53.

Reddy, M. V.; Angers, P.; Gosselin, A. & Arul, J., 1997. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry, 47 (8): 1515-1520.

Rodríguez, R.J., White, J.F., Arnold, A.E. & Redman, R.S., 2008. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182: 314-330 (2009).

Rojas, N.L., 2009. Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación Biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y Poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.

Rojas, G.V., Flores, Ma.S., Larralde, C.P. & Arévalo, K., 2010. Decoloración del Azul brillante de Remazol R (RBBR) en presencia de sulfato de cobre por dos nuevas cepas de *Trametes* sp. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 1(2): 143-154.

Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. & Sullivan, T.J. 1998. Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 29:319-343.

Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M. & Faeth S., 2004. Evolution of endophyte – plant symbiosis. *Trends in plant science*, 9 (6): 1360-1385.

Salvador, M., 2003. Análisis de correspondencias. [en línea] <http://www.5campus.com/leccion/correspondencias>.

Sánchez-Márquez, S., Bills, G.F. & Zalbalgogezcoa, I., 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Divers*, 27: 171-195.

Sánchez-Márquez, S., 2009. Estudio de la micobionta endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. Tesis de Doctorado. Departamento de Microbiología & Genética. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca.

Sanders, I.R., 2004. Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity – are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytologist*, 164: 415–418.

Santos, J.M., Correia, V.G. & Philips, A.J.L., 2010. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction *in vitro* and biological species definition. *Fungal Biology*, 114: 255-270.

- Schulz, B., Römmert A., Dammann U., Aust, H. & Strack, D., 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103: 1275-1283.
- Schardl C.L., Leuchtman A., Spiering M.J., 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315–340.
- Schulz, B. & Boyle, C., 2005. The endophyte continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- Schulz, B., U. Wanke, S. Draeger and H.J. Aust, 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: Effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97: 1447-1450.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK, Krohn K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9): 996-1004.
- Shenoy, B.D., Jeewon, R. & Hyde K.D., 2007. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*, 26: 1-54.
- Sikora, R.A., Schäffer, K., & Dababat, A.A., 2007. Modes of action associated with microbially induced *in planta* suppression of plant-parasitic nematodes. *Australasian Plant Pathology*, 36: 124-134.
- Slippers, B. & Wingfield, M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21 (2-3): 30-106.
- Sreenivasaprasad, S., Meehan, B.M., Mills P.R. & Brown, A.E., 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 39:(3) 499-512.
- Steffen K., Hofrichter, M. & Hatakka, A., 2002. Purification and characterization of manganese peroxidase from the litter–decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:550 – 555.
- Strobel, G., Yang X.S., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S. & Hess, W.M., 1996. Taxol from *pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142: 435-440.

- Strobel, G. & Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2): 257-268.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R. & Murali, T.S., 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23: 9-19.
- Tamura, K., Peterson, N., Peterson, G., Stecher, M., Nei, M. & Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Tour, U., Wariishi, H., Schoemaker, H.E. & Gold, M.H. 1992. Oxidation of phenolic arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. *Biochemistry*, 31: 4986-4995.
- Tudzynski, B. & Sharon, A., 2002. Biosynthesis, biological role and application of fungal phyto-hormones. In: Osiewacz HD, ed. *The mycota X. Industrial applications*. Berlin, Germany. Springer-Verlag. 183-212.
- Tuntiwachwuttikul, P., Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Thadaniti, S. & Taylor, W.C., 2008. Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. *Tetrahedron* 64:7583–7586.
- Urdaneta, L., Araujo, D., Quirós, M., Rodríguez, D., Colmenare, C., Poleo, N., Petit, Y. & Dorados, I., 2009. Micobiota endófitas asociadas a estadios preflorales del guayabo (*Psidium guajava* L.) y al ácaro plano (*Brevipalpus phoenicis*) (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). *Revista UDO Agrícola* 9 (1): 166-174.
- Voragen, F., Beldman, G. & Schols, H., 2001. Chemistry and enzymology of pectins. In: McCleary BV, Prosky L, eds. *Advanced dietary fibre technology*. Oxford, UK: Blackwell Science, 379–398.
- White, J.F.J., 1987. The widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Disease*. 71: 340-342.

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322.
- Wilson, D., 1995. Endophyte: The evolution of a Term, and Clarification of its Use and Definition. *Oikos*, 73:274-276.
- Wilson, P., O'Brien, M., Gadek, P. & Quinn, C. 2001. Myrtaceae Revisited: A Reassessment of Intrafamilial Groups. *American Journal of Botany*, 88 (11): 2013-2025.
- Wilson, P., O'Brien, M., Heslewood, M. & Quinn, C. 2005. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematic Evolution*, 251: 3-19.
- Wong, M.K.M. & Hyde, K.D., 2001. Diversity of fungi on six species of *Gramineae* and one species of *Cyperaceae* in Hong Kong. *Mycological Research*, 105: 1485-1491.
- Yu, H.S., Zhang, L., Li, L., Zheng, C.J., Guo, L. & Li, W.C., 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiology Researches*, 165: 437-449.
- Yuan, Z., Zhang, C., Lin, F., Kubicek, C.P. 2010. Identity, Diversity, and Molecular Phylogeny of the Endophytic Mycobiota in the Roots of Rare Wild Rice (*Oryza granulata*) from a Nature Reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 1642-1652.
- Zabalgoeazcoa, I., 2008. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6 (Special issue), 138-146.
- Zhang, Y.-H.P., Cui, J., Lynd, L.R. & Kuang, L.R. 2006. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules* 7(2):644-648.
- Zomlefer, W., 1994. Guide To Flowering Plant Families. University Of N. Caroline Press. Chapel Hill. London.

8. Anexos

Anexo 1. Análisis moleculares

Extracción de ADN a partir de Micelio Vegetativo (Lee & Taylor, 1990):

1. Se raspó el cultivo fúngico con bisturí estéril y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Se agregaron 400µl de Buffer de lisis (Tris HCL pH 8(50mM), EDTA Na₂ (50mM), SDS) y 5µl de proteinasa K 2% (wt/vol). Se realizó la lisis mecánica con un machacador plástico estéril.
3. Se incubo la muestra a 60°C durante 30 minutos.
4. Se agregaron 112 µl de NaCl 5M y 5µl de CTAB 10x (CTAB 10% (wt/vol), en H₂O destilada).
NOTA: apoyar previamente a su utilización el CTAB en baño para que desgelifique.
5. Se incubo a 65°C durante 10 minutos.
6. Se agregaron 570µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, vol/vol), se agito enérgicamente y se incubo a -20°C durante 30 minutos.
7. Se centrifugo a 10.000 RPM durante 10 minutos.
8. Se transfirieron 400-500µl de sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5ml, se agregaron 20µl de acetato de Na 3M (hacerlo mientras se centrifuga) y se incubo a unos -20°C durante 30 minutos.
9. Se centrifugo a 10.000 RPM durante 10 minutos.
10. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 0.55 volúmenes de isopropanol.
11. Se agito suavemente, se incubo a -20°C durante 30 minutos y se recentrifugó a 10.000 RPM durante 5 minutos.

Dejar a -20°C toda la noche

12. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200µl de etanol 70% (vol/vol).
13. Se centrifugo durante 5 minutos a 10.000 RPM.

14. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet en 50-100µl de TE (Tris HCL 6mM, EDTA 0.1mM, pH 7.5) a 60°C (o en H₂O mQ a la misma temperatura).
15. Se agregó 1µl de RNasa (5µg/ml) y se incubó a 37°C durante 60 minutos.
16. Se almacenó a -20°C.

Anexo 2. Medios de cultivo empleados

MEA (Malt Extract Agar/ Agar Extracto de Malta)

Malta	20g
Agar	20g
Agua	1l

Esterilización a 121°C durante 15 minutos.

Disolver en baño maría el agar y la malta antes de la esterilización.

MEA-CL (Malt Extract Agar-Cloranfenicol/ Agar Extracto de Malta-Cloranfenicol)

Malta	20g
Agar	20g
Agua	1l
Cloranfenicol	100mg

Esterilización a 121°C durante 15 minutos.

Disolver en baño maría el agar y la malta antes de la esterilización. El cloranfenicol se puede esterilizar al mismo tiempo que los otros componentes del medio. La adición del mismo tiene como función primordial la inhibición del crecimiento bacteriano.

PDA (Potato Dextrosa Agar/ Agar Papa Dextrosa)

Papas	250g
Glucosa	20g
Agar	1l

Lavar las papas (deben ser papas blancas), cortarlas en pequeños cubos y ponerlas a hervir en aproximadamente 500ml de agua durante 45 minutos. Filtrar y agregar el agar, previamente fundido en 500ml de agua. Agregar 20g de glucosa y llevar a un litro. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

Medio utilizado para la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium*.

CLA (Clavel Leaf Agar/ Agar - Agua - Hojas de Clavel)

Esterilizar pedacitos de hoja de clavel y repartirlos (3 a 5) por cada caja de Petri con agar-agua (15g por litro)

Este medio es recomendable para la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium*.

Agar- Agua + Acícula de Pino

Esterilizar acículas de Pino y repartirlas (2 a 3) por cada caja de Petri con agar-agua al 2%.

Este medio es recomendable para la identificación de especies pertenecientes al género *Botryosphaeria*.

Medio Celulasas (CMC)

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0g
KCl	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
CaCl ₂	0.2g
4% celulosa molida	250.0ml
Agar	12.0g
Agua destilada	750.0ml

Se esteriliza 15 minutos a 121°C.

Se disuelve la celulosa molida al 4% en 250ml de agua destilada, dejándola reposar en un recipiente 24hs. Finalizado este tiempo se agregan los restantes compuestos llevando a un volumen final de 1lt.

Medio Pectinasas

NH ₄ H ₂ PO ₄	0.9g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1g
KCl	0.5g
Pectina cítrica	1.0g
Agar	12.0g
Agua destilada	1.0lt

El medio preparado se esteriliza por 15min a 121°C.

Luego de inoculadas las colonias e incubadas por 7 a 10 días se tomaron medidas de las mismas, dándonos esto, una estimación de la habilidad de utilizar la pectina por parte de los hongos. Hecho esto, las placas se inundaron con ácido málico (0.1M) por una hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo se descarto al ácido málico, inundando las placas con rojo de rutenio al 0.01% (v/v). Las placas inundadas se dejaron incubadas por 2 días a 4°C. Por último, se desecho el colorante procediendo a lavar con agua destilada por una hora.

Luego de la tinción las placas con agar se tornan rosadas, con zonas rosado oscuro alrededor de las colonias, indicando actividad pectinasa.

Medio Ligninasas

Malta	20g
Agar	20g
RBBR (colorante)	0.1g
Agua destilada	1l

El medio preparado se esteriliza por 15min a 121°C.

Luego de llenadas las placas, se inoculan 3 replicas de cada colonia, viendo los resultados 15 días después de la inoculación, mediante un aclaramiento del medio alrededor de las replicas.

TSA (Tryptona Soya Agar)

TSA	40g
Agua destilada	1l

El medio preparado se esteriliza por 15min a 121°C.