



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Profundización en Microbiología

COMUNIDADES FÚNGICAS ASOCIADAS AL MANTILLO EN  
ESTADIOS INICIALES DE DESCOMPOSICIÓN DEL GUAYABO  
BLANCO (*Eugenia uruguayensis*)

CÉSAR GARCÍA LAVIÑA

TUTOR: DRA. SUSANA TISCORNIA

Tribunal:

Dra. Lina Bettucci

Dra. Sandra Lupo

Dra. Susana Tiscornia

MONTEVIDEO, URUGUAY

2015

*A mi madre y a la memoria de mi padre*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Susana Tiscornia por aceptarme como su pasante, por guiarme en el transcurso de esta Tesis, por transmitirme sus conocimientos, por su muy buena disposición y por ser siempre comprensiva y paciente.

Agradezco a la Dra. Lina Bettucci por aceptarme en el laboratorio, por transmitirme su pasión por la Micología, por estar siempre dispuesta a ayudarme y, por supuesto, por su cariño y confianza.

Agradezco a los que fueron mis compañeros del laboratorio Sandra Lupo, Dinorah Pan, Raquel Alonso, Ana Mionetto, Natalia Calero, Belén Corallo, Agustina del Palacio, Umberto Galvalisi, Sebastián Sánchez, Carlos Segui, Lucía Sessa y Silvina Soria por estar siempre dispuestos a darme una mano.

Agradezco a Juan Marizcurrena y a Vivian Irving por ayudarme en la etapa molecular de este trabajo.

## RESUMEN

La descomposición de los restos vegetales, que se acumulan en el suelo formando el mantillo, es un proceso imprescindible para el reciclado de los nutrientes y, por lo tanto, para un correcto funcionamiento ecosistémico. Los principales agentes que la llevan a cabo son los hongos filamentosos, que en el mantillo forman comunidades muy diversas y heterogéneas que hasta el día de hoy suscitan interés.

En este trabajo se pretendió estudiar la diversidad de hongos asociados al mantillo foliar del guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*), una Myrtaceae nativa, en estadios iniciales de su descomposición. Para ello se hizo uso de dos estrategias de relevamiento de hongos, una indirecta, basada en la siembra de segmentos de hoja en un medio de cultivo, y la otra directa, basada en la incubación de hojas en cámaras húmedas. También se pretendió determinar si ciertas características de las hojas como su nivel de integridad o el tipo de tejido, ya sea lámina o pecíolo, afectan el ensamblado comunitario. Para todo esto se intentó hacer uso de algunos de los últimos avances en el análisis estadístico de la diversidad.

Los inventarios obtenidos para ambas técnicas, aunque incompletos, fueron suficientemente representativos de la comunidad. Entre ambos se encontraron 77 especies de hongos, casi todos pertenecientes al *phylum* Ascomycota. Ninguna especie tuvo un gran dominio de la comunidad, encontrándose muchas especies raras. Por otro lado, las comunidades asociadas a las láminas y a los pecíolos fueron significativamente distintas, siendo además la comunidad de los pecíolos el doble de diversa que la de las láminas. En cambio, el nivel de integridad de las hojas no pareció afectar mayormente la composición de la comunidad, encontrándose solo dos especies que explicarían las pocas diferencias observadas entre hojas íntegras y lesionadas. A partir de estos resultados se formularon diversas hipótesis sobre el ensamblado y desarrollo de las comunidades en las hojas del guayabo blanco. Por otro lado, de la comparación de las comunidades saprotróficas aquí obtenidas con las comunidades endofíticas obtenidas por Tiscornia *et al.* (2012) surgió que un cierto porcentaje de hongos endófitos logran permanecer en el mantillo, aunque los datos aquí obtenidos indicarían una participación mínima de éstos en el proceso de descomposición. Además se constató un aumento sustancial de la diversidad en las comunidades saprotróficas respecto de las endofíticas. Finalmente, distintas especies del género *Diaporthe* parecen asociarse con éxito a los tejidos vivos y muertos del guayabo blanco. Por este motivo, se estudió a nivel filogenético las relaciones existentes entre los aislamientos endófitos con los aquí obtenidos, encontrándose claras vinculaciones y dejando en claro la existencia en estas comunidades de especies que todavía no han sido descritas.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. EL MANTILLO FOLIAR Y SU DESCOMPOSICIÓN .....	1
2. LOS HONGOS .....	2
2.1. Adaptaciones de los hongos para descomponer la materia orgánica .....	3
2.2. La clasificación de los hongos y sus dificultades .....	4
2.3. La identificación de los hongos y sus dificultades.....	6
3. LA ECOLOGÍA DE LOS HONGOS.....	7
3.1. La diversidad de los hongos.....	7
3.2. Las comunidades microbianas.....	8
3.4. Las comunidades fúngicas del mantillo .....	10
3.4.1. La influencia del sustrato en el ensamblado de las comunidades fúngicas del mantillo .....	10
3.4.2. Las sucesiones de hongos en el mantillo foliar .....	11
3.4.3. Otros factores que influyen en el ensamblado de las comunidades fúngicas del mantillo .....	13
3.5. El dilema de los endófitos.....	14
4. EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD.....	16
4.1. Técnicas de muestreo utilizadas en el estudio de la diversidad fúngica del mantillo .....	16
4.2. Herramientas existentes para el análisis de la diversidad .....	18
5. EL GUAYABO BLANCO.....	21
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
1. OBJETIVO GENERAL .....	23
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
1. MUESTREO Y GENERACIÓN DE INVENTARIOS .....	24
1.1. Muestreo .....	24
1.2. Procesamiento de las hojas .....	24
1.3. Relevamiento de hongos por el método indirecto .....	25
1.4. Relevamiento de hongos por el método directo .....	26
1.5. Identificación de los hongos .....	27
1.6. Análisis filogenéticos.....	27
2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD .....	28
2.1. Construcción de las matrices de datos .....	28
2.2. Determinación de la suficiencia de los muestreos .....	29
2.3. Descripción de las distribuciones de frecuencias relativas de incidencia.....	29
2.4. Descripción de la diversidad .....	29
2.5. Estimación de la diversidad .....	30
2.6. Comparación de las comunidades.....	31
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
1. COMUNIDADES OBTENIDAS POR EL MÉTODO INDIRECTO .....	34
1.1. Identificación de los hongos .....	34

1.2. Características de las comunidades obtenidas .....	39
1.3. Análisis de la diversidad .....	40
1.3.1. Distribuciones de frecuencias relativas de incidencia .....	40
1.3.2. Diversidad de orden cero .....	41
1.3.3. Diversidad de orden superior .....	44
1.4. Niveles de colonización de los tejidos .....	45
2. COMUNIDADES OBTENIDAS POR EL MÉTODO DIRECTO .....	46
2.1. Características de las comunidades obtenidas .....	46
2.2. Análisis de la diversidad .....	48
2.2.1. Diversidad de orden cero .....	48
2.2.2. Diversidad de orden superior .....	51
3. CULTIVO VS. CÁMARA HÚMEDA.....	51
4. SAPRÓTROFOS VS. ENDÓFITOS .....	52
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
1. UTILIDAD DE LAS HERRAMIENTAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD.....	54
2. EFECTO DE LA ESTRATEGIA DE MUESTREO EN EL RELEVAMIENTO DE LA COMUNIDAD FÚNGICA .....	56
3. IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES RARAS .....	58
4. INFLUENCIA DEL TIPO DE TEJIDO EN EL ENSAMBLADO COMUNITARIO .....	60
5. INFLUENCIA DE LA INTEGRIDAD DE LAS HOJAS EN EL ENSAMBLADO COMUNITARIO.....	61
6. VINCULACIÓN CON LAS COMUNIDADES ENDÓFITAS.....	63
7. EL CASO PARTICULAR DEL GÉNERO <i>DIAPORTHE</i> .....	64
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO V .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO VI .....</b>	<b>119</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. EL MANTILLO FOLIAR Y SU DESCOMPOSICIÓN

En los ambientes terrestres los principales productores primarios son las plantas, produciéndose más de cien gigatoneladas de biomasa vegetal por año. De ésta solo el diez por ciento es consumida por los herbívoros mientras que el noventa por ciento restante, una vez muerta, se incorpora a la capa superior del suelo denominada mantillo (Gessner *et al.*, 2010). Allí comienza el proceso de descomposición de los restos vegetales, donde una parte de la materia orgánica es mineralizada, otra es inmovilizada y la restante es humificada (Porta *et al.*, 1994). La mineralización de la materia orgánica hace que se liberen a la solución del suelo elementos nutritivos que quedan disponibles para las plantas y microorganismos que de ellos dependen. También conlleva la liberación de enormes cantidades de dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero a la atmósfera. Es por ello que tiene un papel fundamental en los balances atmosféricos globales del carbono, que a su vez influyen en el cambio climático global. Por su parte, la materia orgánica más recalcitrante sufre transformaciones químicas complejas que dan lugar al humus. Éste se descompone y mineraliza muy lentamente, por lo que representa un reservorio a largo plazo de materia orgánica estable en los suelos. En definitiva, es evidente que la descomposición de los restos vegetales tiene un papel fundamental en el ciclado de los nutrientes y en la fertilidad de los suelos (Porta *et al.*, 1994; Berg & McLaugherty, 2008). Este trabajo se centra en el mantillo foliar, también llamado hojarasca, que no solo se descompone más rápidamente que los restos leñosos de tallos y raíces, sino que suele ser el componente principal de los mantillos, llegando a representar el 70% de un mantillo forestal (Lonsdale, 1988).

Ahora bien, si se entiende que la descomposición es un proceso netamente biológico que involucra la transformación y pérdida de masa del material vegetal, sin incluir las pérdidas físicas por abrasión, fragmentación y lixiviado (Gessner *et al.*, 2010), cabe preguntarse quiénes son los agentes biológicos que la llevan a cabo. En el mantillo se puede encontrar una gran diversidad de animales y microorganismos, pero solo algunos de ellos participan directamente del proceso de descomposición entendido de esta forma. Los microorganismos son sin lugar a dudas los principales agentes (Hättenschwiler *et al.*, 2005; Berg & McLaugherty, 2008), estimándose que canalizan alrededor de un 95% del flujo de energía (Persson *et al.*, 1980), mientras que los animales detritívoros –como lombrices, ácaros y colémbolos– dan cuenta del resto.

Entre los microorganismos que siempre se encuentran colonizando el mantillo están los hongos filamentosos, las bacterias y, en menor medida, las levaduras (Jensen, 1974). Entre estos, los hongos filamentosos parecerían estar especialmente diseñados para descomponer los restos vegetales, razón por la cual se les reconoce un papel fundamental en la descomposición (Hättenschwiler *et al.*, 2005; Dighton, 2007; Berg y McClaugherty, 2008; Gessner *et al.*, 2010; Van der Wal *et al.*, 2013). Los hongos se asientan en los restos vegetales formando comunidades muy diversas y dinámicas. De la estructura y composición de estas comunidades depende la tasa a la que se descompone un mantillo, lo que finalmente afecta el ciclo de nutrientes de un ecosistema. Por ello y por la necesidad de tener un registro de la diversidad fúngica a nivel global es que el estudio de estas comunidades ha motivado el trabajo de muchos, incluyendo este mismo.

## **2. LOS HONGOS**

Los hongos son un grupo muy diverso de organismos eucariotas, por lo general haploides, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sin embargo, aunque a veces se hacen notar por sus estructuras reproductoras, la mayoría permanecen invisibles a nuestros ojos durante todo su desarrollo. Esto se debe a que son organismos relativamente simples. Su cuerpo vegetativo puede ser unicelular, como en el caso de las levaduras, o puede estar formado por unos filamentos tubulares microscópicos denominados hifas. Es en estos últimos, los hongos filamentosos, que se centra este trabajo.

Las hifas son rígidas puesto que poseen una pared externa de quitina y glucanos, y crecen solo por sus ápices. Pueden estar más o menos ramificadas y pueden presentar o no septos a intervalos regulares. De haber septos, éstos siempre poseen poros que permiten el flujo citoplasmático y el pasaje de todos o la mayor parte de los organelos según sea el grupo de hongos. El conjunto de hifas de un hongo forma una red denominada micelio, que en condiciones ideales crecería indefinidamente formando una esfera perfecta, pero que en la naturaleza se amolda a las condiciones heterogéneas del ambiente inmediato. Dicho esto, no todas las porciones del micelio tienen la misma vitalidad. La función trófica y de crecimiento está relegada a las porciones más marginales. Allí, los ápices hifales no solo crecen continuamente sino que son los responsables de liberar enzimas degradadoras al medio externo. Estas enzimas reducen los componentes del sustrato en compuestos solubles de bajo peso molecular que son luego absorbidos fácilmente por las porciones inmediatas al ápice. Es por esta forma de nutrición que se considera a los hongos como heterótrofos por absorción. Por su parte, las porciones más centrales, y por tanto más viejas, empiezan acumulando



pigmentos y compuestos de reserva, forman estructuras reproductoras y finalmente entran en senescencia y mueren por autólisis (Jennings & Lysek, 1996).

Sin embargo, los hongos filamentosos no son solo un conjunto de filamentos entrelazados. En determinado momento de su ciclo vital comienzan a formar gran cantidad de esporas, ya sea de origen sexual o asexual. Éstas se encuentran prácticamente en todas partes, invaden el aire y se posan sobre cualquier superficie, esperando encontrar el sustrato adecuado para germinar y desarrollar un nuevo micelio. Las esporas pueden ser unicelulares o pluricelulares, de paredes gruesas o finas, pigmentadas o hialinas, ornamentadas o lisas y de muy diversas formas y tamaños. También suelen formarse en estructuras distintivas y de diversa complejidad. Todo esto determina su resistencia a condiciones adversas, su mecanismo de dispersión y permite también diferenciar los hongos, lo que facilita las tareas de clasificación e identificación.

### **2.1. Adaptaciones de los hongos para descomponer la materia orgánica**

Los hongos, por ser quimio-heterótrofos aerobios no participan tan ampliamente en el ciclo biogeoquímico de los nutrientes como las bacterias, que en su conjunto tienen un metabolismo más diverso. Sin embargo, parecerían estar especialmente adaptados para descomponer la materia orgánica, siendo fundamentales para el ciclo de los nutrientes en los ecosistemas terrestres (Kjoller & Struwe, 1992).

El crecimiento hifal es una adaptación muy importante a la vida terrestre que les permitió a los hongos explorar los suelos penetrando y aprovechando el sustrato de manera mucho más eficiente que las formas unicelulares o de cortas cadenas como las levaduras o las bacterias. Esto se debe a la presión mecánica que ejerce el ápice hifal en crecimiento, permitiéndole a los hongos abrirse paso en el sustrato mientras liberan a su vez la batería de enzimas degradadoras que lo descomponen. Además, el crecimiento hifal confiere otra ventaja adaptativa y es que los hongos pueden traslocar los nutrientes almacenados en las porciones viejas de micelio a las regiones más jóvenes, de manera de poder crecer en áreas de privación de nutrientes a la búsqueda de nuevos parches nutritivos (Kjoller & Struwe, 1992; Van der Wal *et al.*, 2013). Por último, los hongos tienen capacidades enzimáticas bastante versátiles y muchos de ellos están particularmente adaptados a descomponer los recalcitrantes compuestos ligno-celulósicos que abundan en los restos vegetales y que no son muy accesibles para las bacterias (Van der Wal *et al.*, 2013). De hecho, aunque las bacterias también tienen un gran potencial enzimático, un estudio metaproteómico reciente encontró que absolutamente todas las enzimas degradadoras de polímeros presentes en el mantillo de *Fagus sylvatica* eran

de origen fúngico, a pesar de estar bien representadas las bacterias en la comunidad (Schneider *et al.*, 2012). Esto llevó a los autores a postular la idea de un “comportamiento tramposo” de las bacterias del mantillo, que aprovecharían los productos de degradación producidos por las enzimas fúngicas. De generalizarse esta observación quedaría claro el papel central de los hongos en la descomposición de los restos vegetales.

Sin embargo, no todos los hongos están especializados en descomponer los restos vegetales muertos; algunos de ellos prefieren por ejemplo desarrollarse en los seres vivos. Así es que se reconocen tres categorías que describen de qué manera los hongos obtienen sus nutrientes. Los saprótrofos son aquellos que consumen materia orgánica muerta y que nunca provocan el debilitamiento o la muerte de su hospedero, mientras que los necrótrofos matan los tejidos de sus hospederos para luego consumirlos saprotróficamente. Finalmente, los biótrofos se desarrollan en contacto íntimo con las células vivas del hospedero, pudiendo ser mutualistas, como los líquenes y las micorrizas, o parásitos, causándole un perjuicio al hospedero (Cooke & Rayner, 1984). Estas estrategias nutricionales no son mutuamente excluyentes; un hongo puede ser biótrofo y, cuando las condiciones cambian, como la muerte circunstancial del hospedero, pasar a nutrirse saprotróficamente (Cannon & Sutton, 2004). Por lo tanto, en los restos vegetales predominarán por sobre todo aquellos hongos reconocidos como saprótrofos, lo que no quita que se puedan encontrar biótrofos o necrótrofos facultativos.

## **2.2. La clasificación de los hongos y sus dificultades**

Los hongos son un grupo muy diverso de organismos con ciertas particularidades que afectan la forma en que fueron clasificados históricamente, pudiendo llegar a empañar la comprensión de cualquier trabajo sinecológico que de ellos trate. Por ello se explicará brevemente su clasificación, la cual no ha permanecido estática en el tiempo. Los hongos han sido y todavía son objeto de una fuerte reorganización interna en todos sus niveles taxonómicos, con cambios incluso en su ubicación en el árbol de la vida. Sin embargo, estos cambios groseros no son fruto del capricho de los taxónomos sino que reflejan el peso relativo que distintos tipos de caracteres, utilizados para definir parentescos, fueron adquiriendo con el paso de los años. Así fue que los caracteres morfológicos fueron cediendo paso a la bioquímica y la ultraestructura comparadas, para finalmente quedar en jaque ante el avance de las técnicas moleculares. Es que con el advenimiento de la biología molecular, la comparación de secuencias nucleotídicas sujetas a evolución neutral, llamadas cronómetros moleculares, ha revolucionado los esquemas de clasificación.

Los hongos pasaron entonces de ser agrupados con las plantas, por ser inmóviles y tener paredes celulares, a formar por sí solos, dadas sus peculiaridades, el quinto reino de la vida. Hoy en día se los considera el clado hermano de los animales, con quienes forman el grupo de los Opistocontos. El nombre se debe a que comparten como característica ancestral la presencia de un solo flagelo posterior en alguna etapa de su ciclo vital. Sin embargo, la mayor parte de los hongos terrestres perdieron esta característica. Además, las fronteras del reino también han ido cambiando. Ciertos grupos como los Oomycetes y Myxomycetes, que antes se consideraban hongos por sus hábitos de vida similares, pasaron a formar parte de distintos grupos de protistas, mientras que a los Microsporidios se les hizo recorrer el camino inverso y son hoy considerados hongos, aunque muy reducidos y modificados (Blackwell *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, los grandes grupos de hongos se clasificaron según el tipo de estructuras que caracterizan su reproducción sexual. Se reconocieron así dos clases de hongos basales, los Chytridiomycetes y los Zygomycetes, y dos clases de hongos superiores, los Ascomycetes y los Basidiomycetes. Aunque estos nombres todavía son frecuentes en la jerga micológica, ya no se los reconoce como taxones formales. No solo se elevaron sus rangos taxonómicos a los de phylum, como es el caso de Ascomycota y Basidiomycota, sino que surgieron varios phyla novedosos como resultado del desmembramiento reciente de los grupos basales (Blackwell *et al.*, 2012; Hibbett *et al.*, 2007).

Ahora bien, existe una gran cantidad de especies a las que no se les conoció la fase sexual de su ciclo vital y que por lo tanto quedaron por fuera del esquema formal de clasificación. Estas fueron agrupadas dentro de los Deuteromycetes, también llamados hongos imperfectos. Mientras que algunas especies habrían perdido la capacidad de reproducirse sexualmente en el curso de la evolución, para otras el problema reside en que sus estructuras sexuales y asexuales se desarrollan en condiciones y tiempos distintos. Así, se puede encontrar la forma asexual del hongo solamente, llamada anamorfo, o la forma sexual, llamada teleomorfo, o si se tiene suerte ambas formas, el holomorfo. Esta agrupación empezó entonces a reconocerse como artificial al constatarse que muchas especies habían sido descritas dos veces con un nombre para el anamorfo y otro para el teleomorfo. A modo de ejemplo, las especies *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum gloeosporioides* son en realidad la misma especie, el primer nombre representando el teleomorfo y el segundo el anamorfo. Finalmente, los análisis filogenéticos moleculares no solo empezaron a reubicar todas las especies dentro de los phyla formales, sobre todo en Ascomycota, sino que reunieron gran cantidad de anamorfos con sus respectivos teleomorfos. A pesar de todo esto, la nomenclatura doble de los hongos se impuso por mucho tiempo con el famoso Artículo 59 del Código Internacional de Botánica, un

exabrupto del sistema linneano de nomenclatura que dificultó la comunicación científica y generó mucha controversia. Recién en 2011 la lógica de “un hongo, un nombre” prevaleció al anularse dicho artículo, aunque esto trajo aparejadas nuevas dificultades (Hawksworth, 2011; Taylor, 2011; Milius, 2014).

### **2.3. La identificación de los hongos y sus dificultades**

Las dificultades antes expuestas reflejan el peso que siguen teniendo las morfoespecies en la micología. De hecho, la identificación de los hongos suele hacerse en base a sus características morfológicas. Particularmente relevantes son las características micro-morfológicas de las estructuras reproductoras tanto sexuales como asexuales, aunque también suelen ser importantes las características de cultivo de los micelios, como su aspecto general, su color y su velocidad de crecimiento. Sin embargo, aunque se disponga de toda esta información para un aislamiento, las claves y libros específicos necesarios para una correcta identificación no siempre están actualizados o representan los hongos de una zona geográfica distante (Polishook *et al.*, 1996; Paulus, 2004; Hawksworth & Mueller, 2005). Además, la identificación morfológica puede ser poco confiable por las dificultades en la definición y delimitación de géneros y especies (Cannon & Sutton, 2004; Kirk *et al.*, 2004). De todas formas, la tarea no es imposible y, ante la duda, siempre puede tratarse de cotejarse el resultado de la identificación morfológica con el de la identificación molecular, basada ésta en la comparación de secuencias nucleotídicas de una cepa problema con las secuencias disponibles de cepas tipo.

La posibilidad de identificar molecularmente a los hongos mediante “códigos de barras” ha llevado a que se acumulen gran cantidad de secuencias en bancos de datos de acceso público. Esto ha permitido corregir varios errores, redefinir las fronteras entre especies e identificar micelios estériles, además de unificar teleomorfos con sus respectivos anamorfos. Por ejemplo, ciertos géneros como *Diaporthe* y su anamorfo *Phomopsis*, donde las especies eran descritas en función del hospedero en el que se encontraban, han podido ser unificados y ordenados, lo que facilita enormemente su identificación (Gomes *et al.*, 2013). Se pudo ver también que muchas morfoespecies de hongos muy conocidos son en realidad complejos de especies crípticas como sucede en *Cladosporium cladosporioides* (Hyde *et al.*, 2007; Bensch *et al.*, 2010;). Por último, pudieron corregirse varios errores, como el caso del famoso *Penicillium chrysogenum*, que le permitió a Alexander Fleming descubrir los antibióticos y que en realidad un análisis filogenético reveló que se trataba de *Penicillium rubens* (Houbraken *et al.*, 2011). Al día de hoy, todos estos esfuerzos son aún insuficientes para desplazar a la morfología de su

papel central en la identificación de los hongos, aunque, en determinados casos bien estudiados, queda claro que la identificación molecular resulta ser de gran ayuda.

### **3. LA ECOLOGÍA DE LOS HONGOS**

La ecología general se ha nutrido en gran medida de la ecología de los macroorganismos mientras que la ecología microbiana, con su origen en la microbiología clásica, ha corrido por su propio cauce. Es por ello que procesos como la descomposición de la materia orgánica y el reciclado de nutrientes minerales se han dado a menudo por sabidos y han sido tratados como procesos de “caja negra” para la ecología general (Atlas & Bartha, 2002). Sin embargo, la revolución por la que actualmente transita la ecología microbiana está teniendo fuertes repercusiones en la ecología general y ha nutrido los esfuerzos por integrar ambas disciplinas (Prosser *et al.*, 2007; Ramette, 2007). De esta forma, la ecología de los microorganismos se ha supeditado a la teoría ecológica general y, poco a poco, va adoptando sus modelos, su lenguaje, algunas de sus herramientas y también algunas de sus preocupaciones.

#### **3.1. La diversidad de los hongos**

Un tema central de estudio en ecología es la diversidad biológica, entendida de forma laxa como toda la variabilidad de los seres vivos, ya sea la existente dentro de especies, entre especies o entre ecosistemas (Magurran, 2004). Una definición más práctica y acotada considera a la diversidad biológica como sinónimo de la riqueza de especies y de la abundancia relativa de éstas en el espacio y el tiempo (Hubbell, 2001). La riqueza sería simplemente el número total de especies en un determinado espacio y en un determinado tiempo, mientras que la abundancia relativa haría referencia a la rareza o dominancia de cada una de esas especies. Además del interés que la biodiversidad suscita por sí misma, los riesgos que le suponen las actividades humanas, así como sus implicancias en el funcionamiento ecosistémico, han hecho que el foco de atención trascendiera las fronteras de la comunidad científica. El punto de inflexión fue sin lugar a dudas el Convenio de Río de Janeiro sobre la Diversidad Biológica de 1992, donde los 156 estados firmantes se comprometieron a valorar y conservar la biodiversidad de los ecosistemas (Paulus, 2004; Magurran, 2004).

La micología no quedó por fuera de estas discusiones. Algunos micólogos llamaron la atención sobre la importancia de determinar la diversidad fúngica y de conservarla, tanto *in situ* (en su ambiente natural) como *ex situ* (en colecciones) (Hawksworth, 1991; Hawksworth, 1997; Staley, 1997; Hyde, 1997; Hyde *et al.*, 2007). Justificaron esto por ser los hongos una verdadera fuente de potencial genético de relevancia para las actividades humanas, y por los múltiples

servicios ecosistémicos que proveen. Además, hicieron hincapié en la necesidad de generar inventarios globales que tengan particularmente en cuenta las regiones con altos niveles de diversidad y que han sido poco estudiadas como los trópicos. Estas preocupaciones no son menores teniendo en cuenta que la mayor parte de las especies de hongos todavía no han sido descubiertas. Si se considera que la diversidad fúngica global ronda los 1,5 millones de especies –según una estimación conservadora pero bastante respetada (Hawksworth, 1991)– y sabiendo que se han descrito alrededor de 100 mil especies, se deduce entonces que faltaría por conocerse más del 90% del total, una tarea que se estima le llevaría a los micólogos más de 1000 años completar dadas las tasas de descubrimiento actuales (Blackwell, 2011).

Es tal la diversidad fúngica de ciertos ambientes, que ha llegado a ser considerada “indeterminable”, como sucede en suelos de regiones templadas (Christensen, 1981). Lo mismo podría decirse entonces de la diversidad de hongos del mantillo foliar, ya que se considera incluso superior a la del suelo (Bills & Polishook, 1994; Bettucci & Roquebert, 1995). Se han llegado a reportar entre 134 y 228 especies fúngicas cada cinco gramos de hojarasca en una selva tropical (Polishook, 1996) y, de hecho, una sola hoja de un mantillo tropical puede albergar hasta treinta especies diferentes de hongos (Cannon & Sutton, 2004). A su vez, se estima que un 32% de todas las especies fúngicas descritas se encuentran asociadas a tejidos vegetales muertos (Cannon & Sutton, 2004). Todo esto es indicativo de que los hongos saprófitos del mantillo constituyen verdaderamente un grupo híper-diverso cuyo estudio y conservación no deberían ser desestimados.

### **3.2. Las comunidades microbianas**

Una comunidad puede ser considerada como el conjunto de especies que aparecen en un mismo espacio y tiempo (Begon *et al.*, 2006) o como sinónimo de grupos tróficos o taxonómicos particulares que se encuentran en un hábitat circunscripto (Hubbell, 2001; Magurran, 2004). Este trabajo toma la segunda acepción de comunidad, considerando al conjunto de hongos que coexisten en un mantillo como tal. Para entender la gran diversidad y distribución irregular de los hongos asociados al mantillo es necesario comprender cómo se ensamblan las comunidades y qué factores permiten la coexistencia de las especies. Desde la ecología general han surgido dos puntos de vista que intentan explicar y predecir el ensamblado de las comunidades: la teoría de nichos y la teoría neutral de la biodiversidad (Hubbell, 2001; Palma, 2010).

La teoría de nichos, de mayor tradición y peso histórico, es un modelo determinista que se basa en el concepto de nicho introducido por Hutchinson (1957) y en el principio de exclusión

competitiva formulado por Gause (1934). El nicho es el conjunto de requerimientos ambientales y biológicos dentro de los cuales una especie puede crecer y sobrevivir, y el principio de exclusión competitiva afirma que no pueden coexistir dos especies que utilicen los recursos de igual forma y en las mismas condiciones. Según este modelo, la comunidad de un hábitat dado se forma por el conjunto de especies que logran repartirse los recursos limitados, superando tanto los filtros ambientales como los de las interacciones bióticas. Para este modelo, la competencia interespecífica es el factor determinante del ensamblado comunitario (Hubbell, 2001; Palma, 2010; Dumbrell *et al.*, 2010b). De esta forma, el conocimiento detallado de las variables ambientales y los rasgos ecológicos de las especies permitirían predecir el ensamblado comunitario. Sin embargo, la teoría de nichos no ha logrado explicar de forma convincente ni predecir de manera precisa por qué las comunidades tienen muchas especies raras y pocas especies abundantes (Palma, 2010). El argumento que suele utilizarse para explicar la variabilidad observada en la estructura de las comunidades es la existencia de suficiente heterogeneidad ambiental en alguna escala espacio-temporal. Esto causaría una distribución en parches de las especies o el recambio de las mismas con el tiempo (Hubbell, 2001; Dumbrell *et al.*, 2010b).

Más reciente es la teoría neutral de la biodiversidad (Hubbell, 2001), que se enmarca dentro del conjunto de teorías que ponderan los efectos históricos y estocásticos en el ensamblado comunitario. Se nutre de teorías como la de islas biogeográficas y la de metacomunidades, que ponen el énfasis en los procesos de dispersión aleatoria, y asienta el principio de neutralidad según el cual las especies de un nivel trófico dado son equivalentes en términos ecológicos, es decir, tienen las mismas tasas de natalidad, mortalidad, inmigración y extinción (Hubbell, 2001). Estas similitudes entre las especies explicarían entonces la alta diversidad de muchos sistemas naturales, aunque no se puede predecir cuáles serían las especies dominantes y cuáles las raras (Palma, 2010). Entonces, según este modelo, las comunidades son conjuntos siempre cambiantes de especies cuya composición es influida principalmente por las limitaciones a la dispersión y por la estocasticidad demográfica (Hubbell, 2001; Rosindell *et al.*, 2011). En cuanto a las limitaciones a la dispersión, se entiende que es más probable que un hábitat sea colonizado por especies que se encuentran cercanas que por aquellas que no lo están, por lo que los patrones biogeográficos de las especies adquieren relevancia (Martiny *et al.*, 2006; Feinstein & Blackwood, 2013). Por su parte, la estocasticidad demográfica determina la extinción local aleatoria de las especies, promoviendo el recambio continuo por la llegada de inmigrantes. Aunque la teoría no niega la existencia de las interacciones interespecíficas,

evidentemente las excluye como factor relevante en el ensamblado comunitario (Hubbell, 2001).

La tendencia actual es a generar una síntesis que incluya tanto factores históricos y estocásticos como bióticos y ambientales, y que permita predecir la diversidad observada (Palma, 2010; Rosindell *et al.*, 2011). Aunque varios esfuerzos se han hecho en el caso de los macroorganismos, poco se sabe aún de los procesos que estructuran las comunidades en el mundo microbiano (Dumbrell *et al.*, 2010a). Es que algunas peculiaridades de los microorganismos hacen que necesiten especial atención. Desde un comienzo se sugirió que la capacidad de dispersión de éstos sería prácticamente ilimitada debido a su pequeño tamaño y a su inmenso número de potenciales propágulos (Peay *et al.*, 2010). Por lo tanto, esta visión limitó fuertemente la participación de los factores históricos y estocásticos en el ensamblado de las comunidades microbianas. A tal punto es así que se propuso un modelo extremo basado en nichos para los microbios: la hipótesis de Baas-Becking, conceptualizada en la famosa frase “todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona”. En base a dicha hipótesis, distintos hábitats sostendrían entonces comunidades microbianas características (De Wit & Bouvier, 2006; Martiny *et al.*, 2006; Peay *et al.*, 2010).

Contrariamente a esta opinión, estudios de filogeografía microbiana y de genética de poblaciones han demostrado en reiteradas ocasiones las barreras al flujo génico que existen a grandes escalas espaciales. Al mismo tiempo, otros estudios de laboratorio y de campo han mostrado a menor escala que las limitaciones a la dispersión influyen en alguna medida la estructuración de las comunidades microbianas (Kinkel *et al.*, 1987; Peay *et al.*, 2010; Feinstein & Blackwood, 2013). De hecho, se ha visto que aunque algunas especies pueden dispersarse globalmente, otras tantas se dispersan solo a cortas distancias (Martiny *et al.*, 2006). Así, la idea de que “todo está en todos lados” comienza a relativizarse (Hawksworth & Mueller, 2005).

### **3.4. Las comunidades fúngicas del mantillo**

En lo que respecta a las comunidades de hongos del mantillo, se ha estudiado particularmente la importancia del tipo de sustrato en la estructuración de la comunidad y las sucesiones que en él ocurren a medida que progresa la descomposición.

#### **3.4.1. La influencia del sustrato en el ensamblado de las comunidades fúngicas del mantillo**

Originalmente se pensó que los hongos saprótrofos eran generalistas que mostraban escasa o nula especificidad por el tipo de sustrato o por la especie hospedera (Paulus, 2004). Sin



embargo, esta visión se fue diluyendo con el tiempo. Ya en 1949, Westerdijk hacía notar que cada sustrato orgánico en descomposición sustentaba una micoflora característica, y proponía entonces el término “asociación” para referirse a dicha relación específica. Así pues, distintos hongos saprótrofos se asocian a un sustrato particular, ya sea troncos, ramas, raíces, hojas o suelo (Lodge, 1997).

Además, varios trabajos han puesto de manifiesto que entre los hongos saprótrofos existe una cierta preferencia de hospedero debido al bajo nivel de solapamiento que se observa entre las comunidades fúngicas asociadas a los mantillos de distintas especies vegetales (Cowley, 1970; Cornejo *et al.*, 1994; Polishook *et al.*, 1996; Paulus *et al.*, 2006; Hyde *et al.*, 2007). Se ha sugerido el uso del término “recurrencia de hospedero” para describir esta asociación debido a que se trata de diferencias cuantitativas más que cualitativas (Zhou & Hyde, 2001). Las especies saprótrofas recurrentes varían pues en sus abundancias relativas según el hospedero en el que se encuentren, a diferencia de lo que sucede con muchos necrótrofos o biótrosos donde normalmente existe una exclusividad de hospedero que se mide en términos de presencia o ausencia. De todas formas, no todas las especies saprótrofas son recurrentes, algunas como los agaricales de la hojarasca son un ejemplo de hongos saprótrofos prácticamente generalistas, entre los cuales las preferencias se dan por grupos amplios de hospederos, como por ejemplo las angiospermas o las gimnospermas (Lodge, 1997). Luego, otros hongos podrían llegar a ser verdaderamente específicos, si no de especies por lo menos de género o familia de hospederos. Este es el caso de muchas xylariáceas y otros tantos hongos que han sido descritos solo en un tipo de mantillo (Lodge, 1997; Hyde *et al.*, 2007).

En relación a estas asociaciones o preferencias, se ha sugerido que cada sustrato orgánico actuaría como un medio selectivo, cuyas características físicas y químicas, más que la filogenia del hospedero, serían las que determinan la distribución y diversidad de los hongos saprótrofos del mantillo (Westerdijk, 1949; Polishook *et al.*, 1996).

#### 3.4.2. Las sucesiones de hongos en el mantillo foliar

Las comunidades de hongos que se desarrollan en un mantillo no son estables sino que ocurre una sucesión a medida que avanza el proceso de descomposición, entendiéndose ésta como el cambio direccional en la composición, abundancia relativa y distribución espacial de las especies que componen la comunidad (Frankland, 1992). Esto determina que en distintos estadios de descomposición de un mismo sustrato se encuentren comunidades diferentes.

El empobrecimiento del sustrato a medida que avanza la descomposición es un factor importante que determina la sucesión. Primero se pierden los azúcares y los compuestos carbonados simples, luego empiezan a desaparecer las hemicelulosas y la celulosa, y finalmente quedan los compuestos lignificados, más recalcitrantes. Esto hizo que por mucho tiempo se aceptara la hipótesis de que existe una secuencia de grupos nutricionales en los restos vegetales relacionada con la modificación del sustrato (Frankland, 1992). Así, Garret (1951) describió las sucesiones fúngicas en los restos vegetales de manera que iban apareciendo secuencialmente primero los “hongos del azúcar”, luego los hongos celulolíticos y después los ligninolíticos. Además, sugirió la existencia de una fuerte correspondencia entre grupos taxonómicos y grupos funcionales. Por ejemplo, los hongos inferiores aseptados serían los hongos del azúcar, los Ascomycetes y Deuteromycetes serían los hongos celulolíticos y los Basidiomycetes los hongos ligninolíticos (Kjoller & Struwe, 1992). Aunque esta hipótesis tuvo bastante eco, pronto empezaron a acumularse excepciones. Por ejemplo, ciertos Ascomycetes, como las xylariáceas, también son capaces de descomponer los compuestos lignificados (Osono, 2006) y muchos hongos pueden descomponer prácticamente todos los biopolímeros presentes en las hojas, por lo que no se los puede restringir a un sustrato con una composición determinada. Y aunque así fuera, se ha visto que especies con moderada capacidad de descomposición persisten por largos períodos en el sustrato mientras que otras especies capaces de descomponer por completo los restos vegetales son reemplazadas rápidamente por otros hongos. Por si fuera poco, todos los grandes grupos de descomponedores pueden estar presentes desde el primer momento en el proceso de descomposición (Frankland, 1992; Kjoller & Struwe, 1992; Thormann *et al.*, 2003). Por lo tanto, las características físicas y químicas del sustrato, y su cambio en el tiempo, no logran explicar por sí solas la sucesión. Un enfoque multivariado parecería entonces ser más apropiado para explicar las sucesiones (Frankland, 1992). En particular, se ha hecho notar la importancia que podrían tener factores como el efecto fundador, el potencial de dispersión y las interacciones interespecíficas en la colonización, establecimiento y recambio de las especies de una hojarasca en particular (Frankland, 1992; Ponge, 2005; Voříšková & Baldrian, 2012). La visión que hoy impera sobre las sucesiones fúngicas de las hojarasca es por lo tanto más compleja que la propuesta inicialmente por Garret (1951) y se resume a continuación.

La colonización inicial de las hojas ocurre cuando éstas entran en senescencia, encontrándose todavía en el árbol (Jensen, 1974; Ponge, 2005). La comunidad pionera suele estar caracterizada por hongos capaces de tolerar las defensas químicas de la planta, como la concentración de compuestos fenólicos (Ponge, 2005). Además, los hongos con gran potencial

de dispersión y de rápido crecimiento se ven mejor representados en los estadios iniciales debido a un efecto fundador (Ponge, 2005; Crowther *et al.*, 2014). Estos hongos pioneros son también llamados saprótrofos primarios y suelen ser miembros de géneros como *Phoma*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Pestalotiopsis*, *Epicoccum* y *Alternaria* (Sadaka & Ponge, 2003; Osono, 2006). Luego, una vez que las hojas caen al suelo, estos colonizadores primarios terminan de invadir los tejidos y esporulan, completando así su ciclo vital (Ponge, 2005).

En estas condiciones, las dificultades impuestas por la cercanía de vecinos y el solapamiento de nichos hacen que la competencia por los recursos se vaya imponiendo como un factor determinante de la estructura comunitaria. Los “atributos de combate”, como la producción de antibióticos y toxinas, adquieren entonces mayor relevancia, y pueden empezarse a ver en las hojas las reacciones antagónicas por la producción de zonas pigmentadas, zonas de lisis y barreras de micelio. El resultado puede ser el bloqueo mutuo o el reemplazo de un hongo por el otro debido a cambios en el equilibrio de la competencia (Frankland, 1992; Ponge, 2005). Uno de los cambios que pronto ocurren es la pérdida por descomposición y lixiviado de los compuestos inhibitorios de la planta, permitiendo el reemplazo de la comunidad pionera por nuevas oleadas de hongos llamados saprótrofos secundarios o “verdaderos hongos del mantillo”, entre los que se encuentran varios Ascomycetes y Basidiomycetes saprótrofos (Ponge, 2005; Berg & McClaugherty, 2008; Shanthi & Vittal, 2010). Así se establece una comunidad madura, también muy diversa pero con menos especies dominantes que la pionera (Promputtha *et al.*, 2002). En los estadios finales, a medida que el sustrato se empobrece y transita por el proceso de humificación, la microflora queda cada vez más dominada por los hongos típicos del suelo como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Mortierella* (Hudson, 1968; Jensen, 1974; Paulus, 2004). Esta comunidad es menos diversa y queda dominada por menos especies (Promputtha *et al.*, 2002).

#### 3.4.3. Otros factores que influyen en el ensamblado de las comunidades fúngicas del mantillo

Cuando Westerdijk (1949) describió la asociación característica de ciertos hongos con ciertos sustratos, también mencionó que “bajo la influencia de cambios en la temperatura y la humedad pueden producirse alternancias”. Esto significa que las propiedades físicas y químicas del sustrato no son los únicos factores que influyen en el ensamblado de las comunidades fúngicas. De hecho, de la explicación multivariada que se dio de las sucesiones fúngicas en la hojarasca, surge que factores como el efecto fundador y las interacciones interespecíficas entre micelios también moldean la comunidad.

Otros factores que se ha visto influyen en la estructura de las comunidades fúngicas de la hojarasca son las distancias geográficas, la estacionalidad y la fungivoría selectiva. En términos generales, cuando un mismo mantillo ha sido estudiado en diferentes localidades se ha encontrado cierta heterogeneidad en la estructura comunitaria (Polishook *et al.*, 1996; Yanna *et al.*, 2001a; Paulus *et al.*, 2006), aunque en algunos casos no fue significativa (Paulus *et al.*, 2006). En relación a la estacionalidad, se han reconocido incluso comunidades de verano y de invierno bien diferenciadas en ambientes templados (Paulus, 2004; Paulus *et al.*, 2006). Por último, la depredación selectiva por parte de invertebrados fungívoros también ha sido propuesta como un factor influyente en la estructuración de la comunidad fúngica del mantillo, favoreciéndose los miembros menos palatables de la comunidad (Shaw, 1992; Crowther *et al.*, 2011).

De todas formas, al margen de la influencia de estos factores, parecería que siempre existe algún nivel de ruido en la estructura de una comunidad, ya sea por ciertos cambios en la composición o en la relación de abundancias, que no permite la reproducibilidad (Magurran, 2004). Esto mismo fue observado por Paulus (2004) al tomar muestras con dos semanas de separación de un mismo mantillo en una misma localidad. Sugirió entonces que factores como el microclima o el azar pueden jugar un papel importante en la variabilidad a corto plazo de las comunidades fúngicas.

En definitiva, una variedad de factores como la heterogeneidad del sustrato en sus atributos físicos y químicos, el estadio de descomposición diferencial de las hojas, el efecto de factores climáticos y microclimáticos, las limitaciones a la dispersión, el azar y las interacciones interespecíficas, ya sea entre micelios o entre hongos y depredadores, pueden ser la causa todos ellos de la hiper-diversidad de los hongos del mantillo y de su distribución irregular en parches.

### **3.5. El dilema de los endófitos**

En la sucesión antes descrita se parte de una comunidad pionera de hongos que colonizan comúnmente las hojas senescentes por su gran potencial de dispersión. Sin embargo, las hojas no se encuentran asépticas a la llegada de estos hongos. Desde que son formadas, empiezan a ser colonizadas por bacterias y hongos, llamados microorganismos de la filósfera. Los hongos filamentosos de la filósfera pueden separarse conceptualmente en dos grupos: los epífitos, que colonizan la superficie de las hojas, y los endófitos, que colonizan los tejidos internos sin causar síntomas aparentes (Osono, 2006).

Los endófitos son un grupo de hongos muy diversos, en su mayoría Ascomycetes, que han captado la atención de los micólogos. Una planta puede albergar varias especies distintas y, por lo general, distintas especies vegetales presentan comunidades endofíticas características (Stone *et al.*, 2004). Usualmente colonizan los tejidos de forma localizada, no sistémica, infectando unas pocas células o desarrollándose entre éstas, y manteniéndose quiescentes por un determinado tiempo (Stone *et al.*, 2004; Tiscornia, 2012). Esta forma restringida y latente de vivir ha generado muchas especulaciones en relación al papel que cumplen y cómo completan sus ciclos vitales, lo que se ha dado a conocer por algunos como el “dilema de los endófitos” (Hyde & Soyong, 2008). Aunque se han encontrado algunos mutualismos, como sucede con los endófitos de gramíneas (Clay, 1990), éstos parecerían ser más la excepción que la regla. Se ha propuesto entonces que la mayoría de los endófitos interactúan con la planta en el marco de un antagonismo balanceado (Schulz *et al.*, 1998). Desde este punto de vista, los endófitos serían saprótrofos o patógenos latentes que se desarrollan produciendo síntomas cuando el tejido en el que habitan se debilita o se torna senescente (Petrini, 1991; Hyde & Soyong, 2008). Tendrían entonces la ventaja adaptativa de encontrarse ya en los tejidos, teniendo en cuenta lo importante que puede llegar a ser el efecto fundador en el establecimiento y desarrollo de la comunidad (Crowther *et al.*, 2014). De hecho, muchos de los típicos saprótrofos primarios pueden ser encontrados viviendo endofíticamente en las hojas vivas, aunque es más común encontrarlos como epífitos (Osono, 2006). Algunos patógenos latentes frecuentemente hallados como endófitos también pueden persistir un tiempo luego de la muerte de las hojas debido a cierta capacidad limitada de vivir saprotróficamente. Este parecería ser el caso de especies de *Lophodermium*, *Diaporthe*, *Colletotrichum*, *Coccomyces*, *Ascochyta* y *Rhizoctonia* (Osono, 2006).

Ahora bien, qué tan relevantes son los hongos endófitos en el proceso de descomposición es algo que todavía está en discusión (Osono, 2006; Voříšková & Baldrian, 2012). Se ha visto cómo muchos de estos hongos en cultivo axénico son capaces de producir varios tipos de enzimas degradadoras, pudiendo incluso presentar gran actividad ligninolítica como en el caso de las Xylariaceae (Carroll & Petrini, 1983; Kumaresan & Suryanarayanan, 2002; Osono, 2006; Promputtha *et al.*, 2010; Tiscornia, 2012). Sin embargo, su importancia en el proceso está ligada a su permanencia en etapas más avanzadas de la descomposición, algo que no puede deducirse de su potencial enzimático. En relación a esto, la proporción relativa de endófitos en las comunidades de descomponedores parece ser muy variable pero, en términos generales, tienden a ir desapareciendo con el avance del proceso (Osono, 2006).

De todas formas, identificar los endófitos que logran permanecer como saprótrofos es de importancia para entender cómo completan dichas especies sus ciclos vitales. Es decir, se puede sugerir que aquellas especies que permanecen en el mantillo, aunque sea por un tiempo limitado, utilizan las hojas muertas para esporular, y así poder luego reinfectar las hojas vivas nuevamente (Osono, 2006). En general, estos vínculos entre endófitos y saprótrofos se deducen comparando inventarios de morfoespecies obtenidos para una misma planta hospedera en distintos estadios. Sin embargo, se considera que los análisis filogenéticos son más concluyentes a la hora de establecer las afinidades entre pares de ambos grupos (Promputtha *et al.*, 2007; Unterseher *et al.*, 2013).

#### **4. EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD**

##### **4.1. Técnicas de muestreo utilizadas en el estudio de la diversidad fúngica del mantillo**

Según Cannon y Sutton (2004), la invisibilidad de los microorganismos, incluso cuando fructifican, es la principal barrera al entendimiento de su diversidad y del rol que cumplen en los ecosistemas. Es por ello que las técnicas utilizadas para “revelarlos” son de fundamental importancia. Varios han sido los abordajes utilizados para el estudio de los hongos asociados al material vegetal, pudiéndose clasificar éstos en tres tipos: los métodos directos, los indirectos y los independientes de cultivo.

Los métodos directos son aquéllos que implican la observación directa de los hongos en el sustrato haciendo uso de lentes de aumento. Por lo general, el material vegetal es incubado previamente en cámaras húmedas estériles para fomentar la esporulación de los hongos (Krug, 2004). El inventario de especies se obtiene entonces por la identificación de los cuerpos fructíferos formados en el sustrato.

Los métodos indirectos implican el uso de medios de cultivo para estimular el crecimiento de los hongos. El sustrato procesado de alguna forma se siembra en un medio de cultivo selectivo para hongos. Luego de incubarse, se aíslan los micelios que van surgiendo para su posterior identificación. En relación al procesado del sustrato, se han utilizado varios protocolos en los estudios de hongos del mantillo, como por ejemplo la siembra de hojas maceradas o la siembra del agua utilizada para lavar las hojas (Paulus, 2004). Sin embargo, la técnica más utilizada es la de filtración de partículas, en la que las hojas son desmenuzadas y lavadas a través de una serie de mallas en condiciones de esterilidad para luego sembrar una muestra del particulado más fino (Bills & Polishook, 1994). En cambio, el protocolo más utilizado para el aislamiento de hongos endófitos es la siembra en cultivo de pequeños segmentos de material

vegetal desinfectados superficialmente de manera de obtener solo aquellos hongos que logran penetrar los tejidos internos (Cannon & Sutton, 2004).

Más recientemente se han empezado a utilizar abordajes metagenómicos o incluso metaproteómicos para el estudio de los hongos asociados a los materiales vegetales (Schneider *et al.*, 2012; Voříšková & Baldrian, 2012). Estas técnicas son independientes de cultivo, lo que significa que en ningún momento se trabaja con aislamientos ni con las estructuras reproductoras de los hongos. El material es procesado y analizado molecularmente, existiendo distintas técnicas posibles. En particular, las técnicas de secuenciación de nueva generación han permitido obtener resultados más precisos sobre la estructura comunitaria que otros procedimientos como el *fingerprinting* comunitario y la secuenciación de productos de PCR clonados (Voříšková & Baldrian, 2012).

Ahora bien, cuando se trata de tomar una fotografía fidedigna de la comunidad fúngica, se encuentra que todas estas técnicas tienen sus inconvenientes, y es que todas ellas imponen algún tipo de filtro a la diversidad observable. Es así que los métodos directos, a pesar de ser menos costosos y menos laboriosos, no solo exigen un ojo entrenado para la identificación sino que subestiman la diversidad de las comunidades fúngicas (Cannon, 1999; Cannon & Sutton, 2004; Paulus, 2004). Esto se debe a que muchos hongos no son capaces de esporular en esas condiciones y algunos forman cuerpos fructíferos efímeros (Fryar, 2002). Por su parte, los métodos indirectos tienen como desventaja principal el sesgo que se produce a favor de las especies de rápido crecimiento (Hudson, 1968; Cannon & Sutton, 2004). Éstas impiden el crecimiento de las especies lentas o sobrecrecen por encima de ellas imposibilitando su aislamiento. Sumado a esto, algunos hongos no son capaces de crecer en medios artificiales, mientras que sí crecen micelios estériles cuya identificación resulta dificultosa (Cannon & Sutton, 2004; Kirk *et al.*, 2004). Una gran ventaja de los métodos indirectos es la posibilidad de aislar los hongos, lo que facilita la tarea de identificación y permite su conservación *ex situ* para futuros estudios. Por último, las técnicas independientes de cultivo no carecen de inconvenientes. No solo tienen mayores costos sino que todavía no está muy claro qué tan fidedigna es la información cuantitativa sobre las abundancias relativas que brindan (Amend *et al.*, 2010). Por todo esto, varios autores recomiendan utilizar una combinación de protocolos para tener una idea más completa de las comunidades fúngicas presentes en el mantillo (Frankland *et al.*, 1990; Polishook *et al.*, 1996; Cannon & Sutton, 2004; Paulus *et al.*, 2006).

Por último, algunos micólogos resaltan la importancia de hacerse a la tarea de definir y cuantificar con precisión los micro-hábitats existentes dentro de los distintos ambientes, como

una etapa inicial importante a la hora de diseñar un programa de muestreo (Cannon & Sutton, 2004). De hecho, hacen hincapié en que incluso los estudios limitados implican un trabajo considerable y que su valor con fines comparativos puede ser incrementado en gran medida si se siguen protocolos rígidamente definidos. Así, invitan a considerar, entre otros parámetros, el origen de los materiales (raíz, tallo, hoja, filodios, pecíolos, láminas, flores, frutos, semillas), el estado del material (edad y estado de senescencia, fragmentación mecánica o por agentes biológicos, composición química) y la ubicación del material en el hábitat (superficial, enterrado, en el dosel arbóreo).

#### **4.2. Herramientas existentes para el análisis de la diversidad**

En la literatura se pueden encontrar cada vez más herramientas que sirven para describir, estimar y comparar la diversidad de comunidades observadas en el marco de una estrategia de muestreo (McCune *et al.*, 2002; Magurran, 2004; Chao *et al.*, 2005; Jost, 2006; Chao & Jost, 2012; Colwell *et al.*, 2012; Chao *et al.*, 2014). Aunque todas estas herramientas fueron pensadas originalmente para los macroorganismos, poco a poco van siendo incorporadas en los estudios de la diversidad fúngica, incluyendo algunos de los últimos avances en la materia (e.g. Hughes *et al.*, 2001; Paulus *et al.*, 2006; Unterseher *et al.*, 2008). Se pretende aquí dar una visión panorámica del análisis de la diversidad, haciendo énfasis en algunas herramientas que han sido o pueden ser potencialmente utilizadas en el estudio de la diversidad fúngica de las hojarascas.

Cualquiera de las herramientas que se describirán a continuación lo primero que necesitan es un inventario de especies con alguna medida de qué tan frecuente es cada una de ellas en la comunidad. El peso de cada especie puede expresarse en términos de abundancias cuando se cuentan individuos, o de incidencias cuando se cuenta el número de unidades de muestra en las que aparece cada especie. El primer caso es más común para el estudio de la diversidad de animales, mientras que el segundo es el de preferencia para el estudio de plantas, hongos y otros microorganismos, donde los límites entre individuos no siempre son fáciles de determinar (Colwell *et al.*, 2012). Por ello es que se prestará especial atención a las herramientas estadísticas desarrolladas para inventarios basados en incidencias.

Cuando se quiere describir la diversidad de una comunidad (diversidad  $\alpha$ ), quizás la forma más simple de hacerlo es expresando su riqueza. Sin embargo, este descriptor no tiene en cuenta la frecuencia relativa de las especies y, por lo tanto, no incluye el componente de equidad que también hace al concepto. Índices como el de Shannon y el de Simpson fueron creados con el cometido de incluir ambos componentes: la riqueza y la equidad. Otros como el de Pielou o el



de Berger-Parker pretenden en cambio representar en especial la equidad o, la otra cara de la misma moneda, la dominancia (Moreno, 2001; Magurran, 2004).

No obstante, algunos autores han notado cómo estos índices tan populares llevan a errores de interpretación, sobre todo al momento de hacer comparaciones, y han puesto el foco de atención en los ya existentes Números de Hill (Hill, 1973; McCune *et al.*, 2002; Jost, 2006). Éstos son un conjunto de descriptores de diversidad unificados en una ecuación matemática. Cada uno de ellos le otorga un peso distinto a las especies raras y a las dominantes. Esto depende del orden de diversidad escogido, que no es otra cosa más que un coeficiente “ $q$ ” de la ecuación. Lo sorprendente de los Números de Hill es que los valores que se obtienen resultan ser una transformación de los índices antes mencionados. Así, mientras la diversidad de orden cero ( $D_0$ ) es simplemente la riqueza, la diversidad de orden uno ( $D_1$ ) resulta ser el exponencial del índice de Shannon, la diversidad de orden dos ( $D_2$ ) es el inverso del índice de Gini-Simpson y la diversidad cuando  $q$  tiende al infinito ( $D_\infty$ ) es el inverso del índice de Berger-Parker. A diferencia de los viejos índices, todas estas diversidades ( $D_q$ ) siempre se expresan en las mismas unidades: el “número efectivo de especies”. Esta unidad se puede interpretar como el número de especies equivalentes en sus frecuencias que conformarían una comunidad igualmente diversa que la observada. El compartir unidades y su propiedad de duplicación hacen que los Números de Hill sean más intuitivos que los viejos índices de diversidad, por eso son considerados “diversidades verdaderas” (Jost, 2006). Por lo tanto, los Números de Hill parecerían sintetizar la descripción de la diversidad alfa de forma conveniente.

Ahora bien, en grupos híper-diversos como los hongos la diversidad de las comunidades suele ser subestimada. Al ser conjuntos ricos en especies raras se hace prácticamente imposible poder registrarlas a todas. En estos casos, ni el más voluminoso de todos los muestreos ha logrado obtener inventarios completos. Esto ha sido demostrado para el muy particular y laborioso estudio de Kirk (1981, 1982, 1984), que identificó 137 especies de hongos en 44 colecciones tomadas a lo largo de 12 años, y a partir siempre de una misma hojarasca. En base a este inventario, Cannon y Sutton (2004) realizaron una curva de acumulación de especies que dejó en evidencia un muestreo incompleto, estimando ellos que la riqueza real podría ascender a 150.

Para evitar los esfuerzos de muestreo extenuantes es que se han desarrollado y perfeccionado distintas formas de estimar la diversidad real a partir de la observada. En particular, la estimación de la riqueza real es la que ha concentrado mayores esfuerzos, siendo además la más afectada por el submuestreo en comparación con el resto de los descriptores. Existen dos

tipos de estimadores de la riqueza, paramétricos y no paramétricos. Los no paramétricos son los que tienen mayor aceptación, entre los que se encuentran Chao2, Jackknife2 e ICE para muestreos basados en incidencias (Magurran, 2004). Cualquiera de estos estimadores utilizan la riqueza observada y las proporciones de especies raras para obtener el valor estimado.

Otra forma de interpretar la diversidad nace de las curvas de acumulación de especies. Éstas son gráficos que representan cómo aumenta la riqueza cada vez que se agrega una unidad de muestra. Permiten entonces hacerse idea de qué tan completo es un inventario, dado que la curva tiende a asintotizarse a medida que el muestreo se hace suficiente. Con el paso del tiempo se han perfeccionado estas curvas mediante rarefacción y extrapolación, por lo que se puede estimar la riqueza para esfuerzos de muestreo menores y mayores al observado (Colwell *et al.*, 2012). También se han desarrollado, tanto para las curvas como para algunos estimadores no paramétricos, intervalos de confianza que permiten hacer comparaciones significativas entre distintas comunidades (Magurran, 2004; Colwell *et al.*, 2012).

Con el objetivo de comparar comunidades (diversidad  $\beta$ ) se han desarrollado varias herramientas, destacándose los índices de complementariedad, de similitud y de distancias. Algunos de los más utilizados son los índices de similitud de Jaccard y de Sorensen, que solo tienen en cuenta la composición de especies de las comunidades. Éstos han sido luego modificados para incluir la información cuantitativa de las abundancias o incidencias, siendo el índice de Sorensen cuantitativo, o índice de Bray-Curtis, uno de los más recomendados (Magurran, 2004). Incluso se han diseñado estimadores para estos índices, denominados Chao-Sorensen y Chao-Jaccard, que permiten compensar las especies compartidas no vistas (Chao *et al.*, 2005). Estos nuevos estimadores serían más apropiados para evaluar la similitud entre muestras de distintos tamaños, así como en situaciones de submuestreo.

Cuando se tiene un gran número de variables, como lo son las especies de las comunidades, el análisis multivariado también puede ser de gran ayuda. Éste comprende una serie de métodos, algunos exploratorios y otros basados en hipótesis, que analizan todas esas variables simultáneamente, siempre y cuando éstas covaríen en alguna medida. De ocurrir así, estos análisis resumen la información al reducir la complejidad de los datos, facilitando su interpretación (McCune *et al.*, 2002; Ramette, 2007). Tanto en la micología como en el resto de las disciplinas microbiológicas, los métodos exploratorios, como el análisis de conglomerados (*Cluster analysis*) y el análisis de componentes principales (*Principal Components analysis*, PCA), son los más utilizados (Ramette, 2007). Quedan pues muchas herramientas del análisis multivariado que no han sido lo suficientemente aprovechadas y que

resultan promisorias para el estudio de las comunidades microbianas, como ser el escalamiento multidimensional (*Multidimensional scaling*, MDS), el análisis multivariado de la varianza (MANOVA) y el análisis de similitud (ANOSIM), entre tantos otros.

## 5. EL GUAYABO BLANCO

Como ya se ha mencionado, existe en la actualidad gran preocupación a nivel mundial por el impacto de las actividades humanas en los ecosistemas naturales, existiendo evidencias que reflejan cómo dichas actividades llevan a pérdidas o cambios en la biodiversidad (Sala *et al.*, 2000; Gessner *et al.*, 2010). En particular el uso de la tierra con fines productivos es el principal agente de cambio de la biodiversidad, provocando la extinción local de las plantas nativas y de los organismos asociados, como los hongos, cuyo hábitat se encuentra en parte determinado por la composición de las especies vegetales (Sala *et al.*, 2000; Cannon & Sutton, 2004). Teniendo en cuenta esto, resulta de interés tener un registro de las comunidades de hongos asociadas a plantas nativas. En Uruguay ya se ha incursionado en el estudio de las comunidades de endófitos de varias especies nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae (Bettucci *et al.*, 2004; Tiscornia, 2012; Tiscornia *et al.*, 2012; Tiscornia & Bettucci, 2014). Sin embargo, el estudio de la diversidad fúngica asociada al mantillo de una especie de planta en particular hasta ahora no ha sido abordado en el país.

Las Myrtáceas son plantas leñosas aromáticas que se distribuyen en áreas tropicales y subtropicales, y son particularmente diversas en Australia y América del Sur. Además, es la familia que posee el mayor número de representantes leñosos en la flora nativa del Uruguay, contando con 31 especies y dos variedades (Jolochin, 2008). Desde el punto de vista económico, es una familia de gran importancia por los productos maderables de *Eucalyptus* y de *Eugenia*, y por la comercialización de productos comestibles (frutos de *Eugenia*, *Myricaria*, *Psidium* y *Syzygium*) y aceites esenciales (*Eucalyptus*, *Pimenta*, *Melaleuca* y *Syzygium*) (Jolochin, 2008). Sin embargo, *Eucalyptus* es el más importante de todos los géneros de Myrtáceas por su papel central en la industria forestal, y a eso se debe que gran parte de los estudios de hongos asociados a Myrtáceas se hayan enfocado en este género, dejando en un segundo plano los restantes 129 géneros de esta familia. De hecho, entre 1995 y 2003 se describieron 180 nuevas especies fúngicas asociadas a *Eucalyptus*, mientras que para las restantes Myrtáceas solo se describieron 82 especies nuevas (Hyde *et al.*, 2007).

Así pues, para este trabajo se escogió el mantillo foliar de una Myrtácea nativa del Uruguay, *Eugenia uruguayensis* Cambess., conocida vulgarmente como “guayabo blanco”, para la cual además ya se han estudiado las comunidades asociadas de hongos endófitos (Tiscornia, 2012;

Tiscornia *et al.*, 2012). El guayabo blanco es un árbol perennifolio pequeño, que puede alcanzar de cinco a doce metros de altura, de copa densa y de corteza caduca, típicamente maculada. En este trabajo importan particularmente sus hojas, que son simples, pecioladas y opuestas. De forma ovado-oblonga, con un ápice ligeramente acuminado. Miden 3 a 8 centímetros de largo y 1,2 a 3,7 centímetros de ancho, con un pecíolo de no más de un centímetro de largo. Además, son coriáceas, glabras, discoloras y su venación es pinnada, camptódroma y broquidódroma, con la nervadura principal prominente abaxialmente y algo hendida adaxialmente (Legrand, 1968; Brussa & Grela, 2007; Jolochin, 2008).

El guayabo blanco se distribuye naturalmente en Brasil, Paraguay, Uruguay y el noreste argentino, creciendo en los montes ribereños. En Uruguay, es una de las especies de Myrtáceas más distribuidas, pudiendo encontrarse dos variantes: una se halla en la zona del río Uruguay en Salto y Paysandú, mientras que la otra, de hoja más ancha, se encuentra en todo el país, y es la que interesa en este estudio (Legrand, 1968; Jolochin, 2008).

# OBJETIVOS

## 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad de hongos asociados al mantillo foliar en etapas tempranas de descomposición del guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*), una Myrtaceae nativa.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Identificar y comparar la comunidad de hongos utilizando dos abordajes: el método directo y el indirecto.
- ii. Determinar el efecto de las variaciones del sustrato en la estructuración de la comunidad:
  - a. identificando y comparando las comunidades fúngicas de lámina y pecíolo.
  - b. identificando y comparando las comunidades fúngicas de hojas íntegras y de hojas lesionadas.
- iii. Describir la diversidad de estas comunidades haciendo uso de nuevas herramientas desarrolladas para el análisis de la diversidad.
- iv. Comparar las comunidades saprotróficas obtenidas con las comunidades endofíticas de *E. uruguayensis* descritas por Tiscornia *et al.* en 2012.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MUESTREO Y GENERACIÓN DE INVENTARIOS

Para la obtención de un inventario de especies lo más representativo posible de la micoflora saprótrofa del mantillo foliar temprano de *E. uruguayensis* se utilizaron dos estrategias de relevamiento: el método directo basado en cámaras húmedas y el método indirecto basado en el cultivo.

### 1.1. Muestreo

El muestreo se realizó en el parque natural Parador Tajés del departamento de Canelones. El parador queda en la localidad de Los Cerrillos en el kilómetro 51 de la Ruta 47. Es un parque ribereño muy frecuentado en los meses de verano, que se encuentra rodeado por un área agrícola intensiva.

La recolección de hojas del mantillo de *E. uruguayensis* se realizó el 10 de abril de 2012, a principios del otoño, en dos parcelas de cinco metros cuadrados cada una. Se recolectaron hojas en estadios tempranos de descomposición, es decir, hojas caídas que mantienen el color verde con algún grado no muy extendido de clorosis. Las hojas se guardaron en bolsas bien cerradas y fueron puestas en heladera a 5°C el mismo día de la recolección para ser procesadas al día siguiente.

### 1.2. Procesamiento de las hojas

Las hojas se dividieron primeramente en dos grupos según la integridad de sus márgenes. Aquellas que mantuvieron sus bordes intactos fueron incluidas en el grupo de hojas íntegras y aquellas que mostraran a simple vista alguna señal de haber sufrido herbivoría o estrés mecánico durante su vida se agruparon como lesionadas. Las roturas mecánicas provocadas durante el transporte se diferenciaron fácilmente por la ausencia de tejido cicatricial.

Ambos grupos se lavaron con agua y detergente. Luego, se cortaron los pecíolos en segmentos de 5 mm de manera de quedarse con los segmentos más mediales, descartándose los segmentos distales. Con una perforadora de oficina se cortaron las láminas en discos de 6mm de diámetro. Todos los segmentos de pecíolo fueron agrupados indistintamente del grupo de origen, mientras que los discos de lámina se clasificaron en láminas íntegras y láminas lesionadas según la integridad de sus hojas de origen. El resto del material foliar se utilizó para las cámaras húmedas, distinguiéndose también entre hojas íntegras y lesionadas.

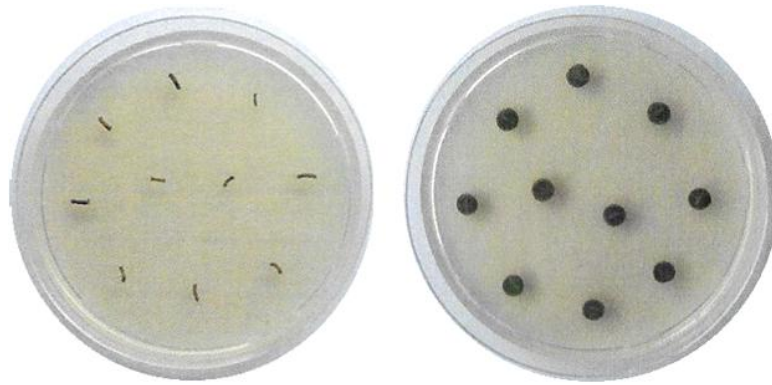
Sumado al lavado inicial con agua y detergente, el material foliar ya procesado –segmentos de pecíolo, discos de lámina y hojas – fue sometido a una desinfección superficial con el fin de evitar el crecimiento de la microflora epífita y el desarrollo de las esporas de resistencia latentes que allí se hubieren depositado. Así, se sometió a cada conjunto a una primera inmersión de un minuto en etanol 80% v/v, una segunda inmersión de dos minutos en hipoclorito de sodio 0,4% v/v y finalmente a tres lavados con agua destilada estéril. Antes de incubar el material, este fue secado con papel de filtro estéril.

Para comprobar la efectividad de la desinfección superficial, se realizaron impresiones del material vegetal en placas de Petri con Agar Extracto de Malta al 2% con Cloranfenicol (MEA-CL) (ver Anexo I). Luego esas placas fueron incubadas esperando no encontrar crecimiento alguno.

### **1.3. Relevamiento de hongos por el método indirecto**

Se incubaron en MEA-CL un total de 183 segmentos de hoja. De estos, 83 correspondieron a segmentos de pecíolo y 100 a discos de lámina (Figura 1). A su vez, de los 100 discos de lámina, 65 correspondieron a láminas íntegras y 35 a láminas con lesión. Las diferencias en el número de segmentos por categoría se deben por un lado a la imposibilidad de recolectar el número necesario de hojas y, por el otro, a que algunos segmentos terminan siendo descartados cuando se generan dudas sobre su correcta desinfección superficial. Lo primero puede explicarse por el hecho de que las hojas recientemente caídas son una fracción menor del grueso de hojas muertas del mantillo, impidiendo que se pudiera recolectar material de sobra. Además, dado que son las hojas las que representan unidades independientes de muestreo, tomar más de un segmento de algunas introduciría pseudo-réplicas en la muestra total, algo que ha sido desaconsejado (McCune *et al.*, 2002). El segmento resulta ser entonces la unidad muestral de este estudio.

Las placas inoculadas con los segmentos, así como las placas del control de desinfección superficial, fueron incubadas en estufa a 25°C con alternancia de luz-oscuridad, dado que la luz negra induce la esporulación de algunos hongos. Durante una semana se siguió el crecimiento de los micelios, aislando los hongos en agar Extracto de malta al 2% (MEA). Luego de determinarse los morfotipos, sus aislamientos correspondientes fueron conservados en tubos con pico de flauta y guardados en heladera a 5°C. Finalmente, una vez identificados, fueron conservados por inmersión en agua destilada estéril a temperatura ambiente (Nakasone *et al.*, 2004).



**Figura 1. Segmentos de pecíolo y discos de lámina sembrados en MEA-Cloranfenicol.**



**Figura 2. Cámaras húmedas luego de ser analizadas.**

#### **1.4. Relevamiento de hongos por el método directo**

Cada una de las hojas a partir de las cuales se tomó un segmento de pecíolo y un disco de lámina fueron utilizadas luego para identificar los hongos por el método directo, basado en la incubación previa en cámaras húmedas. Éstas se construyeron utilizando placas de Petri de vidrio con un papel de filtro dentro, que distribuyera homogéneamente la humedad dada por el agregado de 1 mL de agua destilada, encontrándose todos estos materiales en condiciones de esterilidad (Krug, 2004).

Así, 38 hojas superficialmente desinfectadas se incubaron de a pares en cámaras húmedas a temperatura ambiente, estableciéndose dos grupos: 20 hojas íntegras incubadas en 10 cámaras, y 18 hojas con lesiones incubadas en nueve cámaras. Luego de un mes comenzaron a revisarse una por una las cámaras. En este caso, los hongos no fueron aislados, sino que se observaron directamente los cuerpos fructíferos en el sustrato, teniéndose en cuenta toda la superficie tanto adaxial como abaxial de ambas hojas. La unidad muestral en este caso es el par de hojas de una cámara húmeda (Figura 2), dado que no se pudo descartar el intercambio



de hongos entre ellas, ya sea por la dispersión de las esporas dentro de la cámara o por los micelios que recorrieron el papel de filtro de una hoja a la otra.

### **1.5. Identificación de los hongos**

Los hongos de las cámaras húmedas se identificaron en base a sus características micromorfológicas. Se observaron con lupa estereoscópica y con microscopio óptico de campo claro. Los preparados se realizaron por el método de montaje húmedo o por el método de montaje con cinta adhesiva, y fueron fijados y teñidos con lactofenol - azul de algodón (Li, 2013).

Los aislamientos obtenidos por el método indirecto también se identificaron de esta forma, aunque se pudo contar además con las características macroscópicas de los cultivos. Cuando fue necesario se utilizaron otros medios de cultivo que favorecieran la esporulación de los hongos. Éstos fueron el agar Papa Dextrosa (PDA), el agar Papa Zanahoria (PCA), el agar Hojas de Clavel (CLA) y el agar Nutriente Sintético (SNA) (ver Anexo I).

Ahora bien, cuando estos aislamientos no pudieron ser identificados morfológicamente se recurrió a la identificación molecular. Para ello, se extrajo el ADN fúngico por el procedimiento de Lee & Taylor (1990). Luego se amplificó por PCR la región ITS, que es usada como “código de barras” para los hongos (Schoch *et al.*, 2012). Se utilizaron los primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') específicos para hongos (White *et al.*, 1990), por lo que el amplicón, de unas 600 pb, comprende no solo los dos espaciadores internos transcriptos *its1* e *its2* sino también el gen del rRNA 5.8S. El programa de amplificación empleado consistió en un ciclo a 94°C por dos minutos, 35 ciclos a 94°C por un minuto, 42°C un minuto y medio y 72°C un minuto y medio, y un ciclo final de extensión de 72°C por cinco minutos. Luego de confirmar la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1%, los productos de PCR fueron enviados a MACROGEN, en Seúl, para ser secuenciados. Las secuencias luego se compararon contra el banco de datos del GenBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (Altschul *et al.*, 1990). De esta forma se pudo asignar la especie, o tan solo el género, según el grado de homología.

### **1.6. Análisis filogenéticos**

Con el fin de alcanzar el nivel de especie en la identificación, se realizaron análisis filogenéticos a partir de las secuencias ITS de los aislamientos pertenecientes al género *Diaporthe* por un lado, y de los aislamientos pertenecientes a géneros de tipo *Coniothyrium*

por el otro. Para ello, se incluyeron secuencias utilizadas en trabajos que se dedicaron especialmente a redefinir las especies de estos conjuntos (Gomes *et al.*, 2013; Verkley *et al.*, 2014). Sin embargo, no todas las especies representadas por estos autores fueron incluidas ya que en pruebas iniciales se pudieron descartar ciertos clados por su clara lejanía respecto de los aislamientos problema. A su vez se sobre-representaron, en número de secuencias, las especies que parecieron formar nodos con los aislamientos problema para poner a prueba la robustez de dichos nodos. Como grupos externos se eligieron especies pertenecientes a familias hermanas de los géneros estudiados. Así, para el árbol de *Diaporthe* se utilizó como grupo externo a *Valsa ceratosperma* y *Leucostoma niveum*, ambas de la familia Valsaceae, y para el árbol de los géneros tipo *Coniothyrium*, se eligió a *Heterospora chenopodii* y *Heterospora dimorphospora*, de la familia Leptosphaeriaceae.

En el árbol de *Diaporthe* se incluyeron además las secuencias de los aislamientos endófitos de dicho género asociados también al guayabo blanco, con el fin de evaluar su permanencia como saprótrofos en el mantillo. Estos endófitos se encontraron en un trabajo previo realizado también en el parador Tajés por Tiscornia *et al.* en 2012.

Las secuencias se alinearon usando la herramienta CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) y los árboles filogenéticos se construyeron por máxima parsimonia, usando diez réplicas de adición aleatoria. La robustez de los nodos fue analizada por el método de Bootstrap con 500 réplicas (Felsenstein, 1985). El software MEGA 6.0 fue la plataforma sobre la cual se realizaron estos análisis (Tamura *et al.*, 2013).

## **2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD**

### **2.1. Construcción de las matrices de datos**

Como ya fue mencionado, se registró la presencia de las especies en cada unidad muestral, ya sea ésta un segmento de hoja o una cámara húmeda con un par de hojas. En base a esta información, se construyeron matrices de presencia-ausencia con el listado de especies formando filas y las unidades muestrales formando columnas, existiendo tantas matrices posibles como categorías definidas previamente (para el método indirecto: pecíolo, lámina, lámina íntegra, lámina lesionada; para el método directo: hoja íntegra y hoja lesionada). A estas matrices se les llamará “matrices de presencia-ausencia”. Cuando se suman las apariciones (incidencias) que tuvo cada especie en una categoría, se obtienen las frecuencias de incidencia. De esta forma, las matrices resumidas en términos de frecuencias de incidencia representan los inventarios obtenidos para cada comunidad y se denominarán “matrices de

frecuencias". Por último, al conjunto de unidades muestrales de una categoría se le denominará "muestra de referencia". En las tablas se presentarán las frecuencias de incidencia en porcentaje dados los distintos tamaños de las muestras de referencia.

## 2.2. Determinación de la suficiencia de los muestreos

La suficiencia del muestreo para cada una de las categorías definidas para ambas técnicas se determinó siguiendo el criterio de Anne Chao (Colwell, 2013), según el cual la proporción de especies que aparecen una vez (i.e. únicos) respecto del total de apariciones por categoría debe ser menor al 50%.

## 2.3. Descripción de las distribuciones de frecuencias relativas de incidencia

Se entiende por frecuencias relativas de incidencia al porcentaje del cociente de las frecuencias de incidencia sobre el total de apariciones en una categoría. A partir de estos datos por especie y por categoría se construyeron los gráficos de Whittaker de distribución de abundancias relativas, aquí llamados de distribución de frecuencias relativas de incidencia, para tener una visión gráfica de la cantidad de especies raras y de especies dominantes presentes en cada comunidad. Para comparar las distribuciones de conjuntos distintos, se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras, donde la hipótesis nula es que ambos conjuntos tienen la misma distribución. Se consideraron significativamente distintas las distribuciones cuando  $P < 0,05$ . Luego, se evaluó el ajuste de estas distribuciones a los modelos disponibles en el software PAST (Hammer *et al.*, 2001), para ver cuál explica mejor los datos observados. Los modelos son la serie geométrica, la serie log, la vara quebrada y el log-normal. PAST evalúa la bondad de ajuste a cada modelo por el test de  $\chi^2$ , aceptándose el ajuste al modelo si  $P > 0,05$ . Lo ideal es que  $P$  adopte el valor más alto posible y, de hecho, en base a ello es que se discierne qué modelo se ajusta más, dado que varios suelen sobrepasar en alguna medida la barrera del 0,05 (Magurran, 2004).

## 2.4. Descripción de la diversidad

La diversidad de las distintas comunidades se describe haciendo uso de los Números de Hill definidos para datos de incidencias de la siguiente forma:

$$D_q = \left( \sum_{i=1}^S \left[ \frac{\pi_i}{\sum_{j=1}^S \pi_j} \right]^q \right)^{1/(1-q)}, \quad q \geq 0, q \neq 1,$$

donde  $S$  es el número de especies presentes en la comunidad,  $q$  es el coeficiente que determina el orden de diversidad y  $\pi$  es la probabilidad de aparición del taxón  $i$  (Chao *et al.*,

2014). Cuanto mayor es el orden de diversidad  $q$ , más peso se le otorga a las especies dominantes y menos peso a las especies raras. Además, disminuyen los efectos del submuestreo. Como ya se explicó en la introducción,  $D_q$  se expresa en términos del “número efectivo de especies” (Jost, 2006).

También se representó la diversidad mediante “perfiles de diversidad”, una forma gráfica de ver los Números de Hill, donde se observa cómo varía  $D_q$  en función de  $q$ . Los perfiles de diversidad permiten hacerse una idea de la equidad de las comunidades, dado que una caída pronunciada de  $D_q$  refleja un alto grado de dominancia. Además, se considera que la diversidad de dos comunidades es comparable si sus perfiles de diversidad no se cruzan (McCune *et al.*, 2002; Leinster & Cobbold, 2012).

La equidad de cada comunidad también se calculó en base a los Números de Hill, mediante el índice de equidad de Hill ( $E'$ ) (Hill, 1973; Moreno, 2001):

$$E' = \frac{D_2}{D_1}$$

donde  $D_1$  y  $D_2$  son las diversidades de orden uno y dos respectivamente. Tanto los Números de Hill como los perfiles de diversidad se obtuvieron a partir de las matrices de frecuencias, haciendo uso del software PAST (Hammer *et al.*, 2001).

## 2.5. Estimación de la diversidad

La riqueza ( $D_0$ ) fue estimada utilizando los estimadores no paramétricos Chao2, Jackknife2 y el estimador de cobertura basado en incidencias (ICE), todos ellos específicos para conjuntos de datos basados en incidencias. Estos estimadores se basan en las frecuencias de incidencia de las especies raras para la estimación. Así pues, Chao2 y Jackknife2 tienen en cuenta el número de especies que aparecen en una sola unidad de muestra (número de únicos) y las que aparecen en dos unidades muestrales (número de duplicados). En cambio, el límite de las especies raras para ICE es arbitrario, recomendándose fijar la cota superior en las especies que aparecen en diez unidades muestrales (Magurran, 2004). En este trabajo, debido al tamaño desigual de las muestras de referencia correspondientes a distintas categorías, se prefirió tomar como cota superior de especies raras a aquellas especies que aparecieran en el 10% de las unidades de la muestra de referencia. En el caso de las categorías de cámara húmeda, ICE no fue usado por las pocas unidades de muestra analizadas.

Las estimaciones se obtuvieron con el software EstimateS 9.1.0 (Colwell, 2013), en base a las matrices de presencia-ausencia. En el caso del estimador Chao2, el programa utiliza una

versión corregida para sesgos, aunque se utilizó la versión clásica en las ocasiones en las que el software así lo recomienda. A su vez, con EstimateS se realizaron curvas de rarefacción para los estimadores, lo que permite interpretar si llegan a estabilizarse o no para el tamaño analizado de cada muestra de referencia, computándose 1000 aleatorizaciones para el alisado de las curvas. Se considera que una estimación de la riqueza es confiable solo si llega a estabilizarse; de lo contrario la estimación no es considerada informativa (Unterseher *et al.*, 2013). También se realizaron curvas de acumulación para las diversidades  $D_1$  y  $D_2$  con el fin de visualizar si logran asintotizarse o no.

Con el software iNEXT 1.0 (Hsieh *et al.*, 2013) se realizaron curvas de acumulación de la riqueza que integran la rarefacción y la extrapolación, basada esta última en la versión clásica del estimador Chao2 (Colwell *et al.*, 2012). El programa también provee una medida de la cobertura del muestreo, denominada completitud, que representa la probabilidad de no encontrar una especie nueva al agregarse una unidad de muestra (Chao & Jost, 2012). Se representa gráficamente la relación entre la completitud y el esfuerzo de muestreo, así como la riqueza en función de la completitud. Para todas estas curvas se incluyen intervalos del 95% de confianza, obtenidos usando 160 réplicas de bootstrap. Esto permite comparar la riqueza de distintas comunidades ya que el no solapamiento de los intervalos de confianza a la altura de la muestra de referencia, y más allá, se interpreta como una diferencia significativa en la riqueza de ambas comunidades. Sin embargo, esta forma de inferir la significación estadística ha sido considerada demasiado conservadora por sí misma, y más aún si los tamaños de las muestras de referencia son pequeños o si se extrapola demasiado. Por ello, tal y como se recomienda, no se extrapoló más allá del doble del tamaño de cada muestra de referencia (Colwell *et al.*, 2012).

El grado de solapamiento de los intervalos de confianza fue evaluado preferencialmente en las curvas de la riqueza en función de la completitud y no en las curvas de la riqueza en función del esfuerzo de muestreo. Esto se debe a que las diferencias en los requerimientos de muestreo de comunidades distintas hace que las comparaciones a un mismo número de unidades de muestra no sean apropiadas, mientras que las comparaciones a un mismo nivel de cobertura sí lo serían (Chao & Jost, 2012).

## **2.6. Comparación de las comunidades**

Hasta aquí las comparaciones entre las distintas comunidades estudiadas han tenido en cuenta características meramente cuantitativas, como la distribución de incidencias y el número total de especies. Sin embargo, para conocer qué tan similares o distintas son dos

comunidades es necesario tener en cuenta su composición de especies, es decir, sus características cualitativas. Para ello, en este trabajo se hizo uso de índices de similitud, de estimadores de la similitud y de análisis multivariados.

Para comparar las comunidades de las categorías definidas *a priori* se utilizó uno de los índices de similitud más populares, el índice clásico de Sorensen, que tiene en cuenta el número de especies compartidas:

$$\text{Índice clásico de Sorensen} = \frac{2C}{A + B}$$

donde "A" es el número de especies presentes en la primera comunidad, "B" el número de especies de la segunda comunidad y "C" el número de especies compartidas (Magurran, 2004).

Sin embargo, dado que este índice de similitud desecha la información relativa a las frecuencias de incidencia y, por lo tanto, no tiene en cuenta el peso que cada especie tiene en las comunidades, se incluyó otro índice que compensa estas falencias, el índice de Chao-Sorensen (Chao *et al.*, 2005). Este último es una adaptación del índice clásico que no solo incluye la información cuantitativa, sino que además estima las especies compartidas no vistas, compensando así los efectos del submuestreo. A pesar de esto, en las comparaciones entre comunidades obtenidas por los métodos directo e indirecto se usó solamente el índice clásico, dadas las enormes diferencias en las estrategias utilizadas. Ambos índices fueron aplicados a las matrices de frecuencias de incidencia.

Para tener otro enfoque sobre las diferencias entre las comunidades se hizo uso del análisis de similitudes (ANOSIM) y el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER), disponibles en el software PAST (Hammer *et al.*, 2001), sobre las matrices de presencia-ausencia.

ANOSIM es un método no paramétrico que sirve para determinar si hay diferencias significativas entre dos o más categorías definidas *a priori*, como sucede en este trabajo. Para ello, el método aplica algún índice de similitud a todas las muestras (réplicas) de todas las categorías, construyendo una matriz de disimilitudes. Luego evalúa si las disimilitudes entre réplicas de distintas categorías son mayores en promedio que las disimilitudes dentro de las mismas, obteniéndose un estadístico R. Éste adquiere el valor de 1 cuando la disimilitud entre categorías es total y vale 0 cuando no hay diferencias. Para saber qué tan significativas son las diferencias observadas, se asignan las réplicas de forma aleatoria a distintos grupos unas 10000 veces y se calcula R para cada una de las permutaciones. Así, el R original se compara con la distribución aleatoria para saber si existe una diferencia significativa. El poder de

ANOSIM aumenta con el número de réplicas por categoría, aunque muchas réplicas pueden resultar en valores de R bajos (Clarke & Warwick, 2001).

En el caso de las comunidades de cámara húmeda se utilizó la matriz de presencia/ausencia original. Sin embargo, para las comunidades de cultivo se hizo uso de una matriz condensada, dada la poca información que provee cada segmento. La nueva matriz se construyó agrupando cinco unidades muestrales de forma aleatoria para cada categoría, manteniendo la información en términos de presencia/ausencia. Entre los índices de similitud disponibles en PAST, el escogido fue el índice de Bray-Curtis, muy recomendado entre otras cosas porque no considera que dos comunidades sean más similares por sus ausencias compartidas. Además, aunque sea un índice diseñado para datos de abundancias, varios autores lo usan también para datos de presencia-ausencia. Por último, el nivel de significación se obtuvo por el método secuencial de Bonferroni, tal y como recomienda el programa PAST.

Para saber qué especies contribuyeron más a las diferencias entre las comunidades corroboradas como distintas por ANOSIM, se aplicó el análisis SIMPER, haciendo uso del índice de similitud de Bray-Curtis (Clarke & Warwick, 2001).

Finalmente, para la comparación entre las comunidades saprotróficas aquí estudiadas y las comunidades endófitas descritas por Tiscornia *et al.* (2012) se utilizó también el criterio aplicado por Osono en 2006. Este autor calcula la proporción relativa de endófitos en la comunidad descomponedora de la siguiente manera:

$$\text{Proporción relativa (\%)} = \frac{\sum x \text{ de endófitos en la comunidad descomponedora}}{\sum x \text{ de todos los hongos de la comunidad descomponedora}}$$

donde x es la frecuencia de incidencia.

# RESULTADOS

Se analizó la comunidad de hongos asociados al mantillo foliar del guayabo blanco en etapas iniciales de descomposición utilizando dos metodologías, una indirecta basada en el cultivo y otra directa basada en la incubación en cámaras húmedas. A continuación, los resultados pasan a explicarse separadamente para cada una de las estrategias utilizadas.

## 1. COMUNIDADES OBTENIDAS POR EL MÉTODO INDIRECTO

### 1.1. Identificación de los hongos

Para el total de 183 segmentos de lámina y pecíolo se obtuvo un inventario de 52 taxones que puede apreciarse en la Tabla 1, donde se incluyen las frecuencias de incidencia en porcentaje para cada órgano foliar y nivel de integridad. Todos estos hongos fueron miembros de Ascomycota, con la única excepción de un Oomycete perteneciente a la familia Peronosporaceae. Además, se podría asegurar que todos ellos habrían logrado penetrar de alguna forma los tejidos internos ya que no hubo crecimiento alguno en los controles de desinfección superficial. Las matrices originales de presencia-ausencia pueden encontrarse en el Anexo II. Asimismo, en el Anexo III se detallan algunas características de la mayoría de estos hongos en relación a su distribución, preferencia de sustrato, fitopatogenicidad y clasificación. También se adjunta en dicho Anexo material fotográfico original de los cultivos y, para algunos hongos, micrografías originales de sus estructuras reproductoras características.

En relación a su identificación, 25 de los hongos encontrados fueron identificados en base a sus características morfológicas, 20 mediante técnicas moleculares (ver Anexo IV) y los siete restantes fueron clasificados como micelios estériles, dos hialinos y cinco oscuros. Estos últimos no desarrollaron estructuras reproductivas que permitieran la identificación morfológica, ni tampoco pudieron ser identificados molecularmente. Entre los que sí fueron clasificados formalmente, a 32 de ellos se les pudo asignar una especie, a nueve tan solo el género, a tres la familia y a uno la clase.

Para los aislamientos de los géneros tipo *Coniothyrium* se intentó llegar a nivel de especie con un criterio filogenético. En base al árbol de máxima parsimonia de la Figura 3 se pudo identificar dos aislamientos como *Paraconiothyrium fungicola*, uno como *Paraconiothyrium archidendri*, otro como *Microsphaeropsis arundinis* y, finalmente, un aislamiento quedó hermanado a las especies del género *Dendrothyrium* con un apoyo de bootstrap total, por lo que fue identificado como *Dendrothyrium* sp..

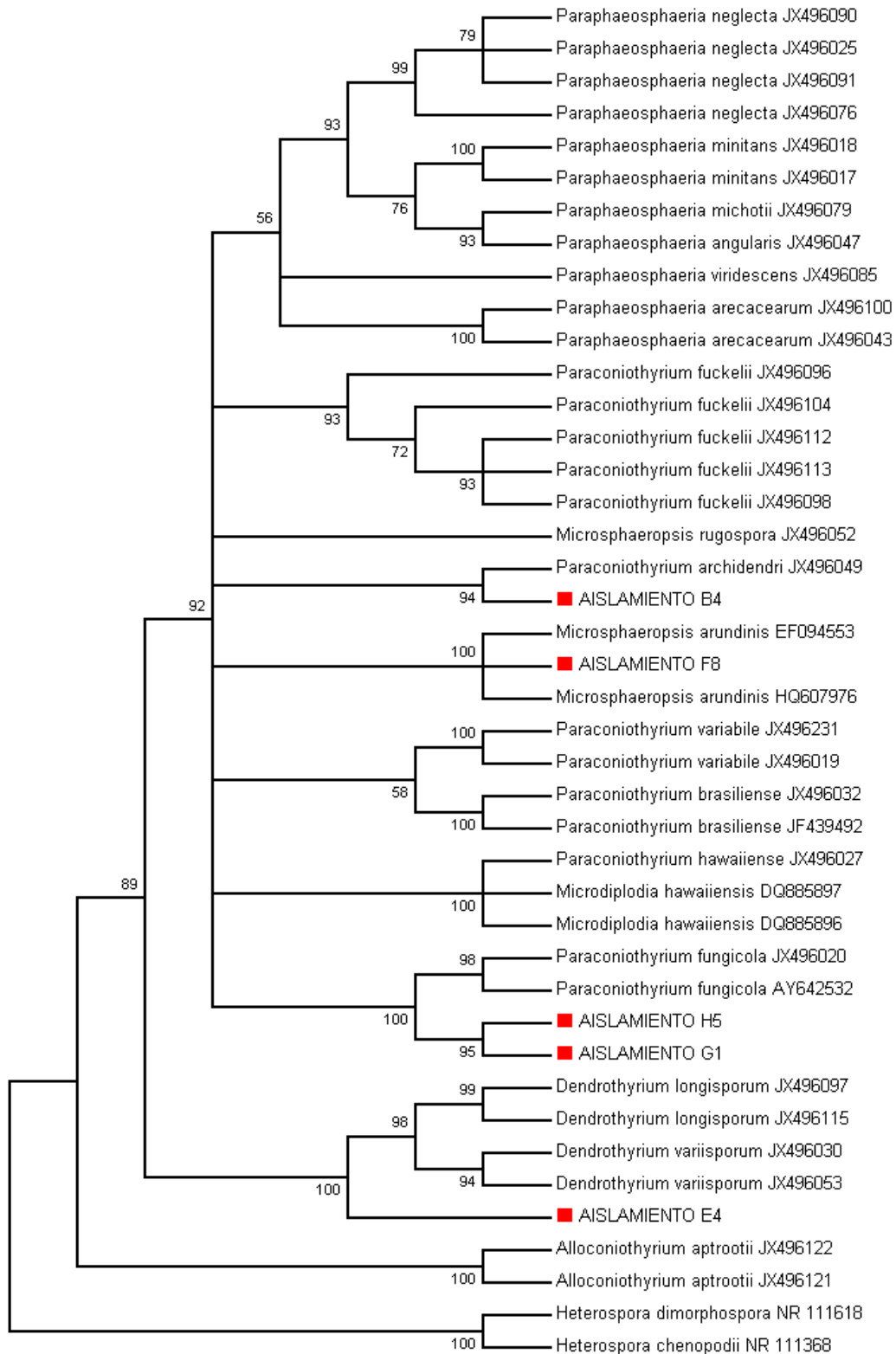


**Tabla 1. Inventario de hongos saprófitos obtenido por el método indirecto**

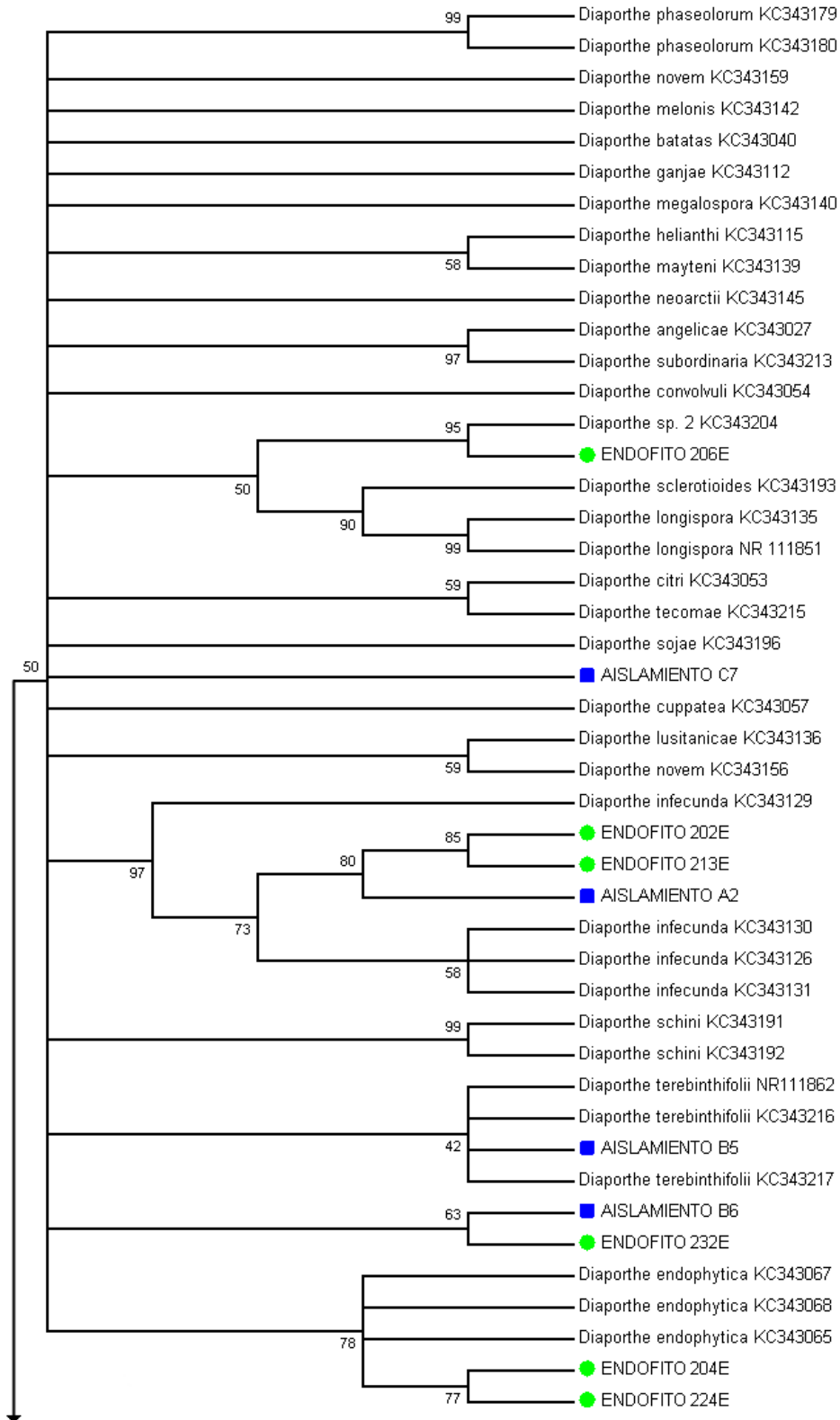
Taxones	Frecuencia de incidencia (%) **			
	P	L	LI	LL
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	6,0	3	1,5	5,7
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud	1,2			
<i>Bartalinia robillardoides</i> Tassi		1		2,9
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.	2,4			
<i>Beltraniella portoricensis</i> (F. Stevens) Piroz. & S.D. Patil	2,4			
<i>Beltraniella</i> sp. 1* Subram.		2	3,1	
<i>Beltraniella</i> sp. 2* Subram.		8	4,6	14,3
<i>Calonectria insularis</i> C.L. Schoch & Crous	3,6	7	6,2	8,6
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	3,6	2	3,1	
<i>Coleophoma crateriformis</i> (Durieu & Mont.) Höhn.		8	6,2	11,4
<i>Coleophoma empetri</i> (Rostr.) Petr.	1,2	7	9,2	2,9
<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove		2	3,1	
<i>Coniella castaneicola</i> (Ellis & Everh.) B. Sutton	2,4	2		5,7
<i>Cylindrocladiella elegans</i> * Crous & M.J. Wingf.	1,2			
<i>Dendrothyrium</i> sp.* Verkley & Stielow	1,2			
<i>Diaporthe foeniculacea</i> * Niessl		9	9,2	8,6
<i>Diaporthe infecunda</i> * R.R. Gomes, C. Glienke & Crous	1,2			
<i>Diaporthe oxae</i> * R.R. Gomes, C. Glienke & Crous	2,4			
<i>Diaporthe</i> sp. 1 Nitschke*	2,4			
<i>Diaporthe</i> sp. 2 Nitschke*	1,2	1		2,9
<i>Diaporthe terebinthifolii</i> * R.R. Gomes, C. Glienke & Crous	22,9	2		5,7
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	2,4	2	3,1	
<i>Fusarium dlamini</i> Marasas, P.E. Nelson & Toussoun	1,2			
<i>Fusarium incarnatum</i> (Desm.) Sacc.	13,3			
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	1,2			
<i>Fusarium sambucinum</i> Fuckel	10,8			
<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Sacc.	1,2			
<i>Leptostroma</i> sp.* Fr.		1		2,9
<i>Microsphaeropsis arundinis</i> * (S. Ahmad) B. Sutton	1,2			
<i>Paraconiothyrium archidendri</i> * Verkley & Stielow	7,2	1		2,9
<i>Paraconiothyrium fungicola</i> * Verkley & Wicklow	1,2	1	1,5	
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm.) Steyaert	2,4	16	16,9	14,3
<i>Phialemonium</i> sp. W. Gams & McGinnis	1,2			
<i>Phoma</i> sp. Sacc.	20,5			
<i>Phyllosticta eucalyptorum</i> Crous, M.J. Wingf., F.A. Ferreira & Alfenas	1,2			
<i>Seimatosporium dilophosporum</i> (Cooke) B. Sutton		2	3,1	
<i>Sphaeropsis sapinea</i> * (Fr.) Dyko & B. Sutton	3,6			
<i>Stemphylium botryosum</i> Sacc.	1,2			
<i>Trichoderma reesei</i> E.G. Simmons	1,2			
<i>Xylaria</i> sp. Hill ex Schrank		3	3,1	2,9
<i>Zetiaspizna acaciae</i> * Crous	1,2			
Especie perteneciente a Peronosporaceae* de Bary		1	1,5	
Especie perteneciente a Phacidiaceae* Fr.		2		5,7
Especie perteneciente a Phaeosphaeriaceae* M.E. Barr	1,2			
Especie perteneciente a Sordariomycetes* O.E. Erikss. & Winka	1,2			
Micelio estéril hialino 1	2,4			
Micelio estéril hialino 2	2,4	1	1,5	
Micelio estéril oscuro 1		2	3,1	
Micelio estéril oscuro 2	1,2			
Micelio estéril oscuro 3		1		2,9
Micelio estéril oscuro 4	1,2			
Micelio estéril oscuro 5	2,4			
<b>Número de segmentos analizados</b>	<b>83</b>	<b>100</b>	<b>65</b>	<b>35</b>

\* Taxones identificados por métodos moleculares.

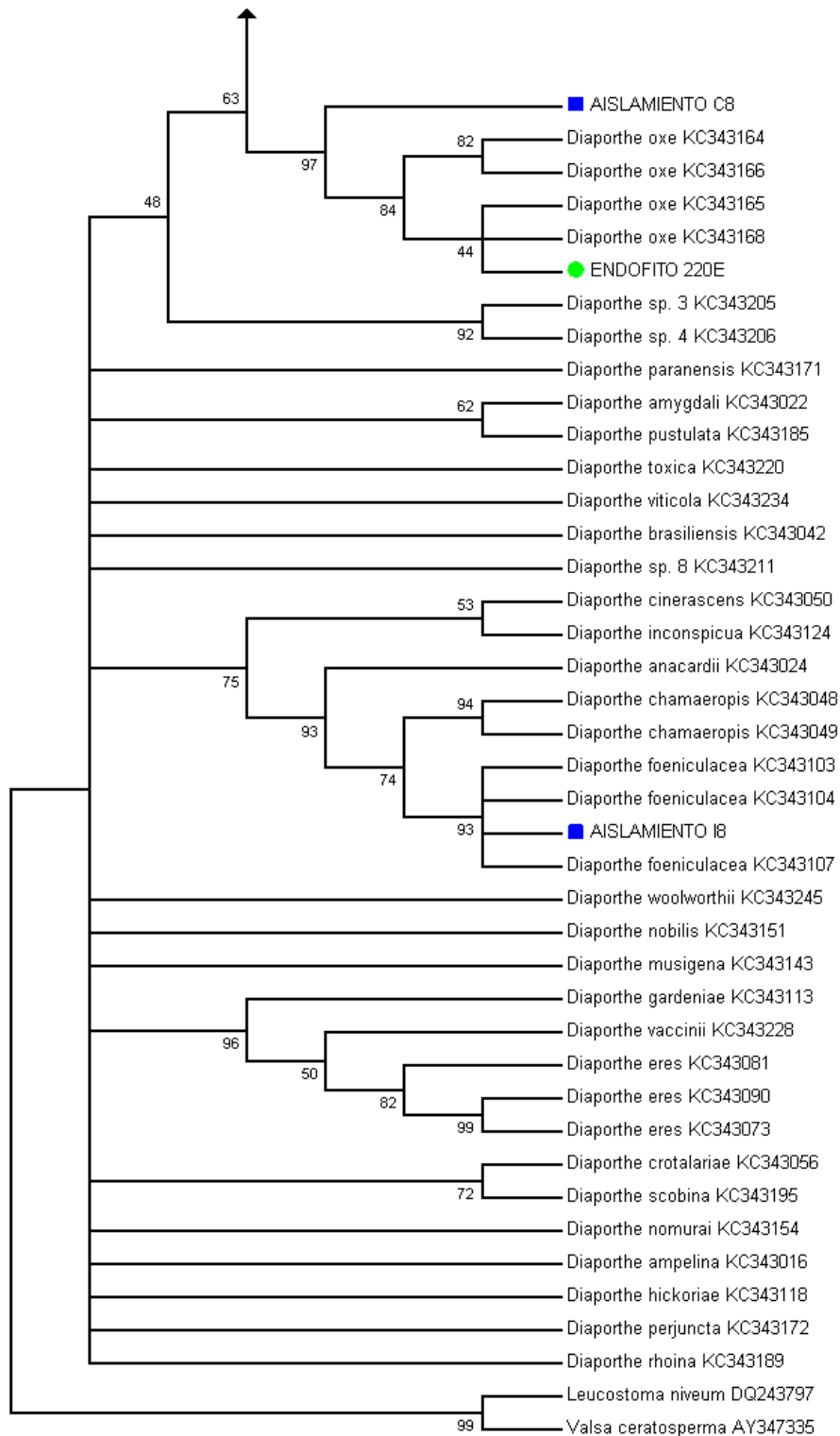
\*\* P. peciolo: L. lámina: LI. lámina íntegra: LL. lámina lesionada.



**Figura 3. Árbol más parsimonioso para los géneros tipo *Coniothyrium* inferido por máxima parsimonia.** Análisis de 42 secuencias ITS (209 sitios informativos) que incluyen cinco aislamientos de este trabajo (cuadrados rojos), 35 representantes de los géneros tipo *Coniothyrium* y dos especies del género *Heterospora* como grupo externo. Se muestran los nodos con apoyo de bootstrap mayor al 50%. Árbol de 582 pasos de longitud, con un índice de consistencia de 0,63 y un índice de retención de 0,84.



**Figura 4. Árbol más parsimonioso para el género *Diaporthe* inferido por máxima parsimonia.** Análisis de 86 secuencias ITS (147 sitios informativos) que incluyen seis aislamientos de este trabajo (cuadrados azules), siete aislamientos encontrados como endófitos por Tiscornia *et al.* (2012) (círculos verdes), 71 representantes del género *Diaporthe* estudiados por Gomes *et al.* (2013) y dos especies de la familia Valsaceae como grupo externo. Se muestran los nodos con apoyo de bootstrap mayor al 40%. Árbol de 883 pasos de longitud, con un índice de consistencia de 0,32 y un índice de retención de 0,67.



**Figura 4.** (Continuación)

Para los aislamientos del género *Diaporthe* se siguió la misma estrategia, pero en este caso se incluyeron las secuencias de los *Diaporthe* endófitos del guayabo blanco encontrados previamente por Tiscornia *et al.* (2012). El árbol filogenético (Figura 4) permitió asignar los 13 aislamientos endófitos y saprótrofos a ocho especies de *Diaporthe*. Entre los casos donde la

asignación de especie fue clara se encuentran: dos aislamientos endófitos y uno saprótrofo que quedaron comprendidos dentro del clado de *D. infecunda*; dos endófitos agrupados dentro de *D. endophytica*; un endófito dentro de *D. oxe*; un aislamiento saprótrofo dentro de *D. foeniculacea*; y un endófito que se agrupó con una especie no definida formalmente por Gomes *et al.* (2013). Luego, en otros casos la definición fue más arriesgada: un aislamiento saprótrofo quedó hermanado al clado de *D. oxe* y fue clasificado como tal al quedar por fuera las especies encontradas como hermanas al clado por Gomes *et al.* (2013); un saprótrofo identificado como *D. terebinthifolii* que se agrupó a dicho clado con bajo apoyo de bootstrap pero que tuvo una homología del 100%, según el alineamiento por BLAST, con la secuencia de la cepa tipo (Anexo IV). Finalmente, para algunos aislamientos no se alcanzó el nivel de especie: tal es el caso de un saprótrofo que quedó formando parte de una politomía de varias especies, al que se le denominó *Diaporthe* sp.1; y dos aislamientos, uno saprótrofo y uno endófito, que quedaron agrupados en solitario y fueron llamados *Diaporthe* sp. 2.

## 1.2. Características de las comunidades obtenidas

Para analizar la estructura comunitaria y las preferencias por sustrato de los hongos en relación a las distintas categorías definidas –pecíolo, lámina, lámina íntegra y lámina lesionada– se procedió primero a determinar si dichas categorías definidas *a priori* sustentaban realmente comunidades diferentes. Para ello se realizó el análisis de similitudes (ANOSIM), especialmente diseñado para determinar la pertinencia de las categorías definidas *a priori*. Éste reveló que las comunidades fúngicas de pecíolo y de lámina fueron significativamente distintas ( $R = 0,66$ ,  $p = 0,0001$ ), aunque la magnitud de las diferencias no resultó ser muy alta. Por otro lado, dejó en evidencia que las diferencias entre las comunidades de lámina íntegra y de lámina lesionada no fueron significativas ( $R = 0,12$ ,  $p = 0,1284$ ). Estos resultados son además congruentes con los obtenidos por el estimador de similitud de Chao-Sorensen (Tabla 2), según el cual las comunidades de lámina íntegra y lámina lesionada resultaron ser realmente muy similares, mientras que las comunidades de lámina y pecíolo solo fueron medianamente similares. En cambio, el índice clásico de Sorensen, que no es un estimador y que solo tiene en cuenta la información cualitativa de las comunidades, mostró niveles de similitud sustancialmente menores para todos los casos (Tabla 2). Por todo esto, en lo que refiere a las comunidades obtenidas por el método indirecto, se hará énfasis en el análisis de las comunidades de lámina y de pecíolo.

Así pues, para los 83 segmentos de pecíolo hubo un total de 39 taxones con 116 apariciones. Solo cuatro de ellos aparecieron en más del 10% de los segmentos. Estos fueron *Diaporthe*

*terebinthifolii*, *Phoma* sp., *Fusarium incarnatum* y *Fusarium sambucinum*, en orden decreciente de frecuencia de aparición. En el otro extremo, 10 taxones aparecieron en solo dos segmentos (duplicados), mientras que 20 aparecieron una sola vez (únicos). Luego, para el conjunto de los 100 segmentos de lámina hubo 87 apariciones y 25 taxones. Solo *Pestalotiopsis guepinii* sobrepasó la barrera del 10% de segmentos colonizados. En este caso se observaron nueve duplicados y ocho únicos. Cabe destacar que ninguna especie tuvo una frecuencia de aparición de más del 23% para cualquiera de los dos conjuntos. Finalmente, las especies que contribuyeron en más de un 5% a las diferencias entre las comunidades de lámina y pecíolo según el análisis multivariado SIMPER fueron *Phoma* sp., *Pestalotiopsis guepinii*, *Diaporthe terebinthifolii* y *Fusarium incarnatum*, en orden de importancia (ver Tabla V.1 del Anexo V).

**Tabla 2. Similitud entre distintas categorías**

Comparación de categorías *	Índice clásico de Sorensen	Estimador de Chao-Sorensen
<b>Definidas para el método indirecto</b>		
entre saprótrofos		
L vs. P	0,38	0,50
LI vs. LL	0,49	0,78
entre endófitos **		
EL vs. EP	0,44	0,62
entre endófitos y saprótrofos **		
T vs. ET	0,14	0,12
L vs. EL	0,11	0,08
P vs. EP	0,12	0,07
<b>Definidas para el método directo</b>		
HI vs. HL	0,52	0,77

\* L, lámina; P, pecíolo; LI, lámina íntegra; LL, lámina lesionada; T, lámina y pecíolo; EL, lámina para endófitos; EP, pecíolo para endófitos; ET, lámina y pecíolo para endófitos; HI, hoja íntegra; HL, hoja lesionada.

\*\* Las comunidades endófitas fueron descritas por Tiscornia *et al.* (2012).

### 1.3. Análisis de la diversidad

#### 1.3.1. Distribuciones de frecuencias relativas de incidencia

La predominancia de las especies raras tanto en la comunidad de lámina como en la de pecíolo se hace evidente en el gráfico de Whittaker de la Figura 5, donde se representa la distribución de las frecuencias relativas de incidencia para ambos conjuntos. Según el test de Kolmogorov-Smirnov, ambas distribuciones fueron significativamente distintas ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, en ambos casos las distribuciones se ajustaron al modelo de serie logarítmica más que a cualquier otro modelo (Pecíolo:  $P = 0,66$ ; Lámina:  $P = 0,99$ ). Finalmente, y en concordancia con el aparatado anterior, las distribuciones de frecuencias relativas de

incidencia de las comunidades de lámina íntegra y lámina lesionada no fueron significativamente distintas según la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

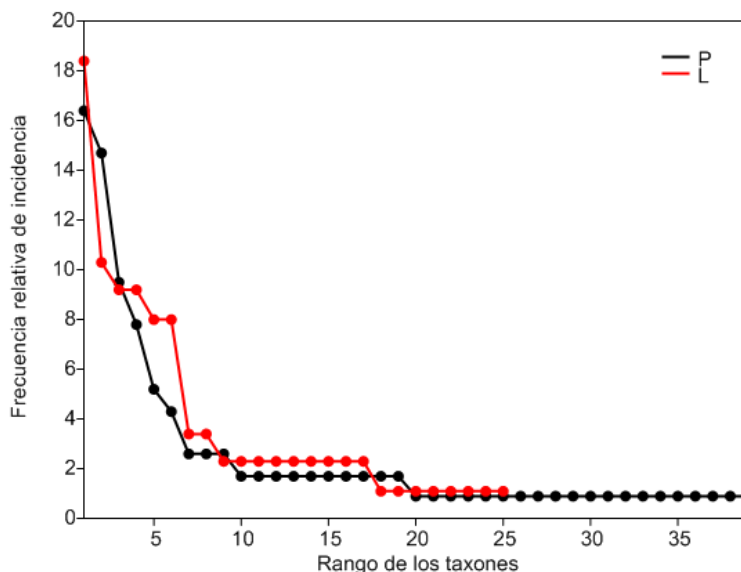


Figura 5. Gráfico de Whittaker para las frecuencias relativas de incidencia de lámina (L) y peciolo (P).

Tabla 3. Diversidad de las distintas categorías

Categorías	Nº muestras	Diversidades **							Equidad de Hill (E')
		S obs	Chao 2	Jackk2	ICE	D1	D2	D $\infty$	
<b>Método indirecto</b>									
Peciolo	83	39	56,1	68,6	65,6	22	13,5	6,1	0,61
Lámina	100	25	28,5	32,0	33,7	16,7	12,1	5,4	0,73
Lámina íntegra	65	17	17,7	18,1	19,3	13	10,2	4,7	0,78
Lámina lesionada	35	16	20,1	25,7	21,8	13,3	11,5	7	0,86
Peciolo endófitos*	100	10	10,6	-	-	3,8	2,3	1,6	0,61
Lámina endófitos*	100	13	17,0	-	-	8,1	6,1	3,4	0,75
<b>Método directo</b>									
Hojas íntegras	10	23	31,1	37,2	-	18,1	14,5	6,2	0,80
Hojas lesionadas	9	27	34,0	41,3	-	21,5	18,0	9,9	0,84
Total hojas	19	37	56,9	61,3	-	26,3	20,3	8,3	0,77

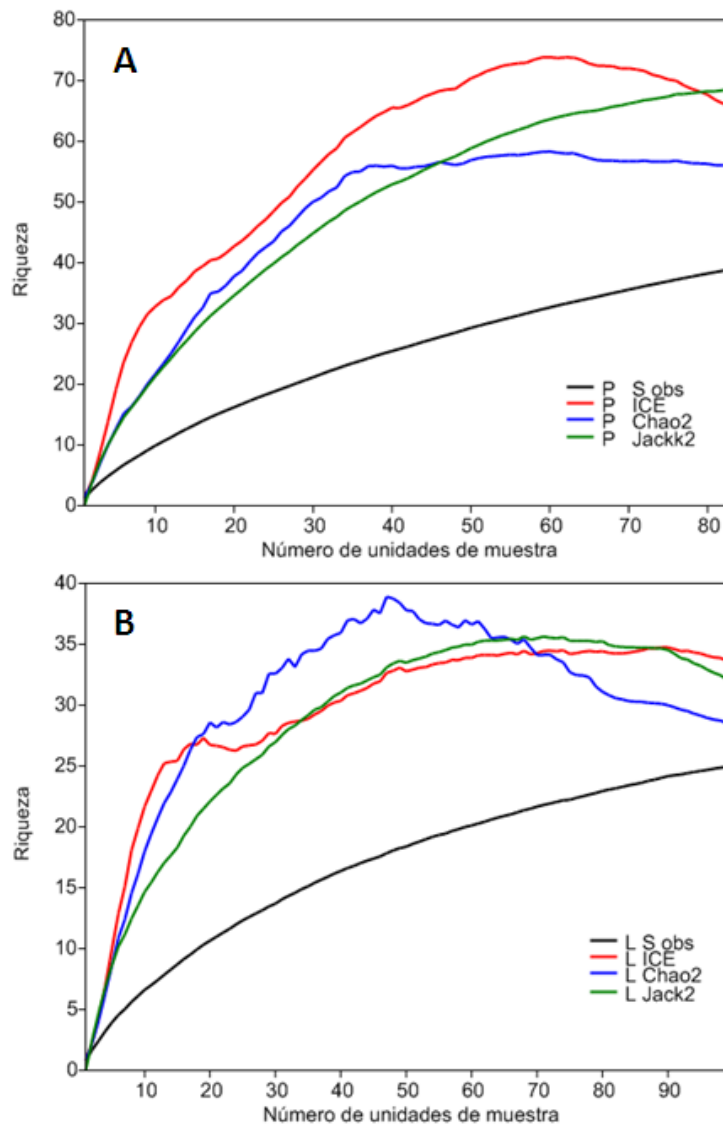
\* Comunidades endófitas descritas por Tiscornia *et al.* (2012).

\*\* D<sub>0</sub>, diversidad de orden cero (riqueza) con S obs, riqueza observada, y Chao2, Jackknife2 e ICE riquezas estimadas; D<sub>1</sub>, diversidad de orden uno (exponencial del índice de Shannon); D<sub>2</sub>, diversidad de orden dos (inverso del índice de Gini-Simpson); D $\infty$ , diversidad de orden tendiente a infinito (inverso del índice de Berger-Parker).

### 1.3.2. Diversidad de orden cero

Ya se ha mencionado la riqueza observada de cada comunidad, sin embargo, la también llamada diversidad de orden cero se sabe resulta muy influida por el esfuerzo de muestreo, más que cualquier otro orden de diversidad. Para tener entonces una aproximación lo más fidedigna posible de la verdadera riqueza de estas comunidades fúngicas se utilizaron los

estimadores no paramétricos Chao2, ICE y Jackknife2, cuyos resultados se exponen en la Tabla 3. De entre ellos, solo las estimaciones dadas por Chao2 e ICE lograron estabilizarse para el volumen muestral de lámina y el de pecíolo (Figura 6). En cambio, la estimación de Jackknife2 solo logró estabilizarse para el conjunto de lámina y no así para el de pecíolo, por lo que fue considerado poco informativo. De los tres estimadores, Chao2 fue siempre el que estimó una menor riqueza.

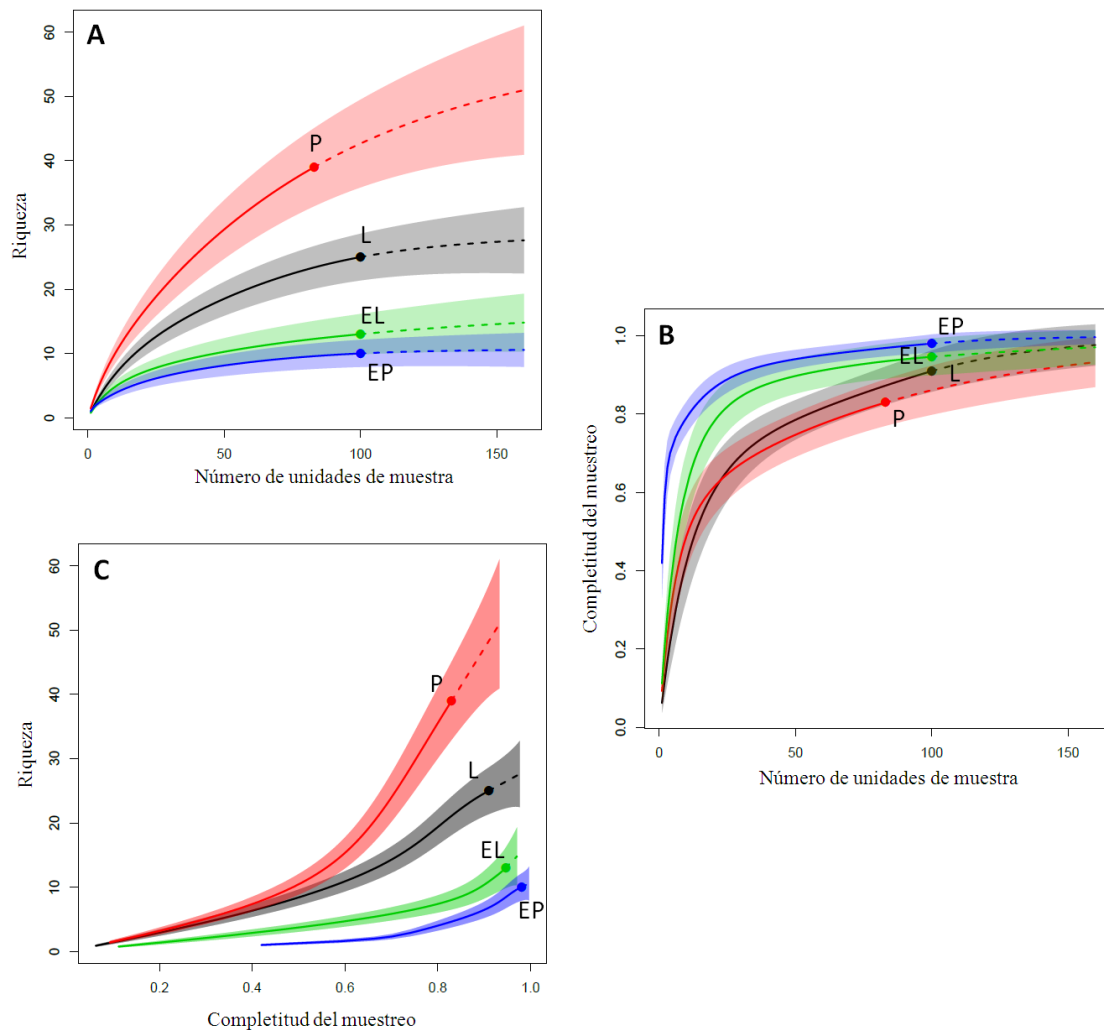


**Figura 6. Desempeño de los estimadores para las comunidades obtenidas por el método indirecto.** Curvas de acumulación de los estimadores de la riqueza ICE, Chao2 y Jackknife 2 y de la riqueza observada (S obs.). **A)** para el conjunto de pecíolo; **B)** para el conjunto de lámina.

Queda claro que los muestreos de lámina y pecíolo fueron incompletos al observarse las curvas de acumulación en función del esfuerzo de muestreo, donde no se logró alcanzar una asíntota a la altura de las muestras de referencia (Figura 7.A). De todas formas, ambos muestreos fueron suficientes teniendo en cuenta el criterio de Anne Chao. Además, la



completitud calculada fue bastante satisfactoria, llegando a ser 0,91 para la lámina y 0,83 para el pecíolo. Esto refleja que la probabilidad de encontrar una especie nueva si se analizara una unidad de muestra más, sería de 0,09 para la lámina y de 0,17 para el pecíolo. Por lo tanto, las especies restantes por ser encontradas constituyen especies raras. Esto último y la representación de la completitud en función del esfuerzo de muestreo (Figura 7.B) hacen notar que se necesitaría una labor muy intensiva de muestreo para poder completar el inventario.



**Figura 7. Rarefacción y extrapolación de la riqueza de las comunidades obtenidas por el método indirecto.** Se representan las curvas para las comunidades de lámina (L, gris) y pecíolo (P, rojo) obtenidas en este trabajo, y de las comunidades endófitas de lámina (EL, verde) y pecíolo (EP, azul) obtenidas por Tiscornia *et al.* (2012). Las líneas sólidas representan la rarefacción, las líneas punteadas la extrapolación, el punto grueso la muestra de referencia y las regiones coloreadas los intervalos de confianza del 95%. **A)** riqueza en función del esfuerzo de muestreo; **B)** relación entre la completitud y el esfuerzo de muestreo; **C)** riqueza en función de la completitud del muestreo.

En base a los estimadores de la riqueza Chao2 e ICE se pudo hacer comparaciones más ajustadas a la realidad entre las distintas comunidades. Si se calcula la razón entre la riqueza estimada de la comunidad de pecíolo y la de lámina se observa que tanto para Chao2 como

para ICE el pecíolo tiene prácticamente el doble de riqueza que la lámina ( $P/L_{\text{Chao2}} = 1,97$ ;  $P/L_{\text{ICE}} = 1,95$ ). Esto no se hace evidente con las riquezas observadas, donde la razón adquiere un valor bastante menor ( $P/L_{\text{Obs}} = 1,56$ ), quizás por el esfuerzo de muestreo más completo para lámina que para pecíolo. De igual forma, las curvas de acumulación mostraron que el pecíolo fue significativamente ( $P < 0,05$ ) más rico en especies que la lámina debido al no solapamiento de los intervalos de confianza para una cobertura de muestreo mayor a 0,6 (Figura 7.C).

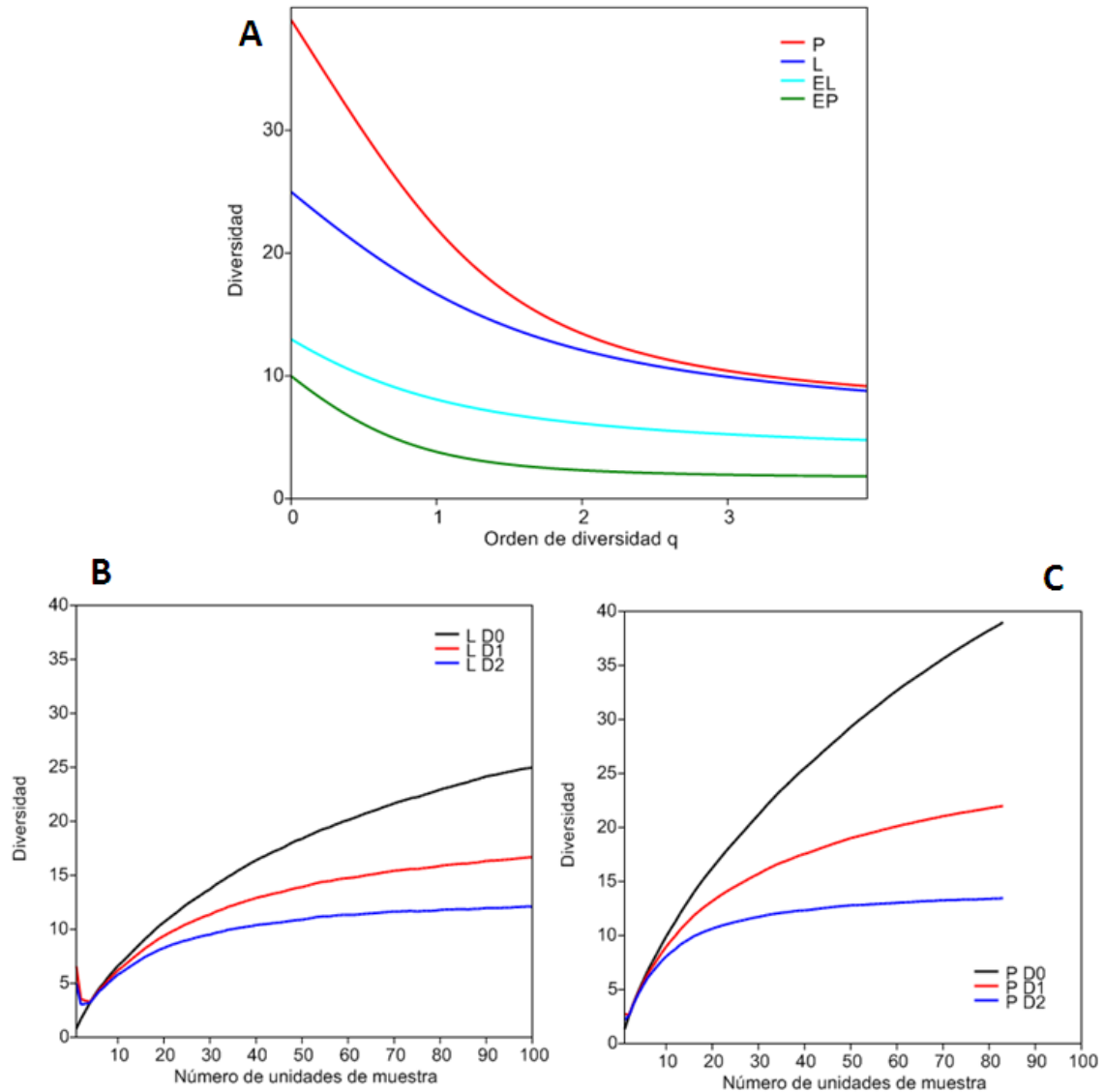
Los subconjuntos de lámina íntegra y lámina lesionada demostraron no tener diferencias significativas, esta vez en relación a sus riquezas dado el gran solapamiento de sus intervalos de confianza en las curvas de acumulación (ver Figura V.1 del Anexo V).

### 1.3.3. Diversidad de orden superior

A pesar de ser la riqueza comúnmente utilizada como índice de diversidad, no es conveniente que sea el único indicador de la misma ya que no tiene en cuenta el componente de equidad/dominancia que también forma parte del concepto. Los perfiles de diversidad que integran muchos órdenes de diversidad dan cuenta de los dos componentes de la misma y permiten interpretarla cabalmente. Así, en la Figura 8.A se exponen los perfiles de diversidad de pecíolo y de lámina conjuntamente, y en la Tabla 3 se detallan los valores de algunos de los órdenes de diversidad para ambos conjuntos, así como la equidad de Hill. Si se admite que el no cruzamiento de las curvas permite determinar un orden en las diversidades, entonces se puede decir que la comunidad fúngica asociada al pecíolo es más diversa que la que se encuentra asociada a la lámina. Es en  $D_0$  que las curvas se separan más y a medida que aumenta el orden de diversidad tienden a aproximarse mucho. A tal punto es así, que las comunidades de pecíolo y de lámina tienen casi el mismo número equivalente de especies a órdenes de magnitud mayores al inverso del índice de Simpson ( $D_2$ ). Esto refleja que ambas comunidades tienen aproximadamente el mismo número efectivo de especies dominantes y que las grandes diferencias están dadas por la mayor presencia en pecíolo de especies raras. Todo esto determina que la comunidad de lámina sea más equitativa, lo que se refleja en un perfil de diversidad menos decreciente que el de pecíolo y en un valor de equidad de Hill mayor.

Ahora bien, qué tan afectados se encuentran estos valores de diversidad por las deficiencias del muestreo puede interpretarse a partir de las curvas de acumulación de la diversidad (Figuras 8.B y 8.C). Allí se puede observar que las diversidades de orden mayor se asintotizan más rápido y por lo tanto están menos influenciadas por el esfuerzo de muestreo. Así, mientras la diversidad de orden dos parece alcanzar una asíntota tanto para el conjunto de

lámina como para el de pecíolo, la diversidad de orden uno solo parece asintotizarse para el conjunto de lámina.

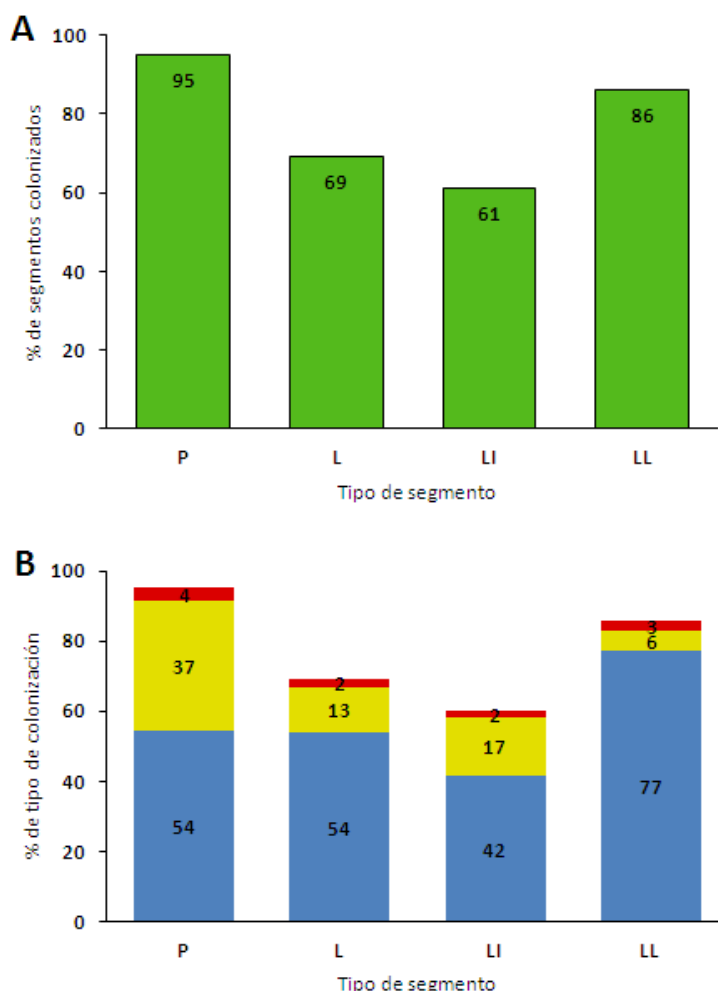


**Figura 8. Perfiles de diversidad y curvas de acumulación de las diversidades para las comunidades obtenidas por el método indirecto.** En **A**, perfiles de diversidad para las comunidades saprótrofas de lámina (L) y pecíolo (P) obtenidas en este trabajo y para las comunidades endófitas de lámina (EL) y pecíolo (EP) obtenidas por Tiscornia *et al.* (2012). En **B** y **C**, curvas de acumulación de las diversidades  $D_0$ ,  $D_1$  y  $D_2$  para los conjuntos saprótrofos de lámina y pecíolo respectivamente. El alisamiento de estas curvas se logró al computarse 1000 aleatorizaciones.

#### 1.4. Niveles de colonización de los tejidos

El grado de colonización de los segmentos fue dispar entre las distintas categorías (Figura 9.A). Mientras que la casi totalidad de los segmentos de pecíolo albergó algún hongo, los niveles de colonización de la lámina fueron mucho menores. Sin embargo, el conjunto de lámina no fue para nada homogéneo en este sentido, los segmentos de lámina con lesiones tuvieron niveles de colonización un 26% por encima de los segmentos de lámina íntegra.

También es de destacar que no siempre se encontró un hongo solo en los segmentos colonizados. Hasta tres especies distintas pudieron hallarse en un segmento, aunque esta situación nunca superó el 4% de los casos (Figura 9.B). En cambio, la colonización por dos hongos llegó a ser la realidad de casi el 40% de los segmentos de pecíolo, mientras que en los distintos tipos de lámina este valor fue notoriamente inferior.



**Figura 9. Niveles de colonización fúngica de los segmentos analizados por el método indirecto.** Los resultados se presentan por categoría: P, pecíolo; L, lámina; LI, lámina íntegra; LL, lámina lesionada. **A)** porcentaje de colonización total; **B)** porcentaje de segmentos colonizados por uno, dos y tres hongos separadamente.

## 2. COMUNIDADES OBTENIDAS POR EL MÉTODO DIRECTO

### 2.1. Características de las comunidades obtenidas

La comunidad registrada por observación directa de las cámaras húmedas se compone de 37 taxones pertenecientes a Ascomycota (Tabla 4). Todos estos hongos habrían logrado colonizar los tejidos internos de las hojas ya que no hubo crecimiento alguno en los controles de desinfección superficial. En este caso los hongos solo fueron identificados por la morfología de

sus estructuras reproductivas. A 28 hongos se les pudo asignar una especie y a nueve tan solo el género. En relación a los niveles de colonización, por par de hojas presentes en una cámara húmeda hubo en promedio 7 hongos, nunca más de 11 ni menos de dos. En el Anexo II se adjuntan las matrices originales de presencia-ausencia y en el Anexo III se detallan algunas características de la mayoría de estos hongos, incluyendo en algunos casos micrografías originales de sus estructuras reproductoras características.

**Tabla 4. Inventario de hongos saprótrofos obtenido por el método directo**

Taxones	Frecuencia de incidencia (%) *		
	T	HI	HL
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	37	20	56
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.	16	10	22
<i>Beltraniella portoricensis</i> (F. Stevens) Piroz. & S.D. Patil	79	90	67
<i>Blastomyces dermatitidis</i> Gilchrist & W.R. Stokes	16	30	
<i>Calonectria insularis</i> C.L. Schoch & Crous	21	40	
<i>Ceratocystis</i> sp. Ellis & Halst.	5		11
<i>Cercophora samala</i> Udagawa & T. Muroi	11	20	
<i>Chaetomium funicola</i> Cooke	5		11
<i>Chloridium botryoideum</i> (Corda) S. Hughes	5		11
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	11	20	
<i>Cladosporium</i> sp. Link	5		11
<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	32	20	44
<i>Coleophoma empetri</i> (Rostr.) Petr.	26	40	11
<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove	21	10	33
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	16	30	
<i>Coniella castaneicola</i> (Ellis & Everh.) B. Sutton	5	10	
<i>Coniothyrium</i> sp. Corda	5	10	
<i>Corynascus sepedonium</i> (C.W. Emmons) Arx	16		33
<i>Cytospora chrysosperma</i> (Pers.) Fr.	5		11
<i>Dactylaria eucalypti</i> Vittal & Dorai	37		78
<i>Diaporthe</i> sp. Nitschke	32	40	22
<i>Dictyochoeta assamica</i> (Agnihotr.) Aramb., Cabello & Mengasc.	37	30	44
<i>Dinemasporium</i> sp. Lév.	5		11
<i>Discosia strobilina</i> Lib. ex Sacc.	5	10	
<i>Fusarium</i> sp. Link	16	10	22
<i>Mariannaea elegans</i> (Corda) Samson	5		11
<i>Mycoleptodiscus</i> sp. Ostaz.	37	10	67
<i>Periconia byssoides</i> Pers.	5		11
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm.) Steyaert	53	50	56
<i>Pseudoseptoria donacis</i> (Pass.) B. Sutton	11		22
<i>Ramichloridium australiense</i> Arzanlou & Crous	5	10	
<i>Sarocladium killense</i> (Grütz) Summerb.	16	10	22
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	11		22
<i>Sporidesmium dioscoreae</i> M.B. Ellis	5		11
<i>Sympodiella</i> sp. W.B. Kendr.	5	10	
<i>Wiesneriomyces laurinus</i> (Tassi) P.M. Kirk	32	30	33
<i>Xylaria</i> sp. Hill ex Schrank	5		11
<b>Número de cámaras húmedas analizadas</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>9</b>

\* HI, hoja íntegra; HL, hoja lesionada; T, total de hoja.

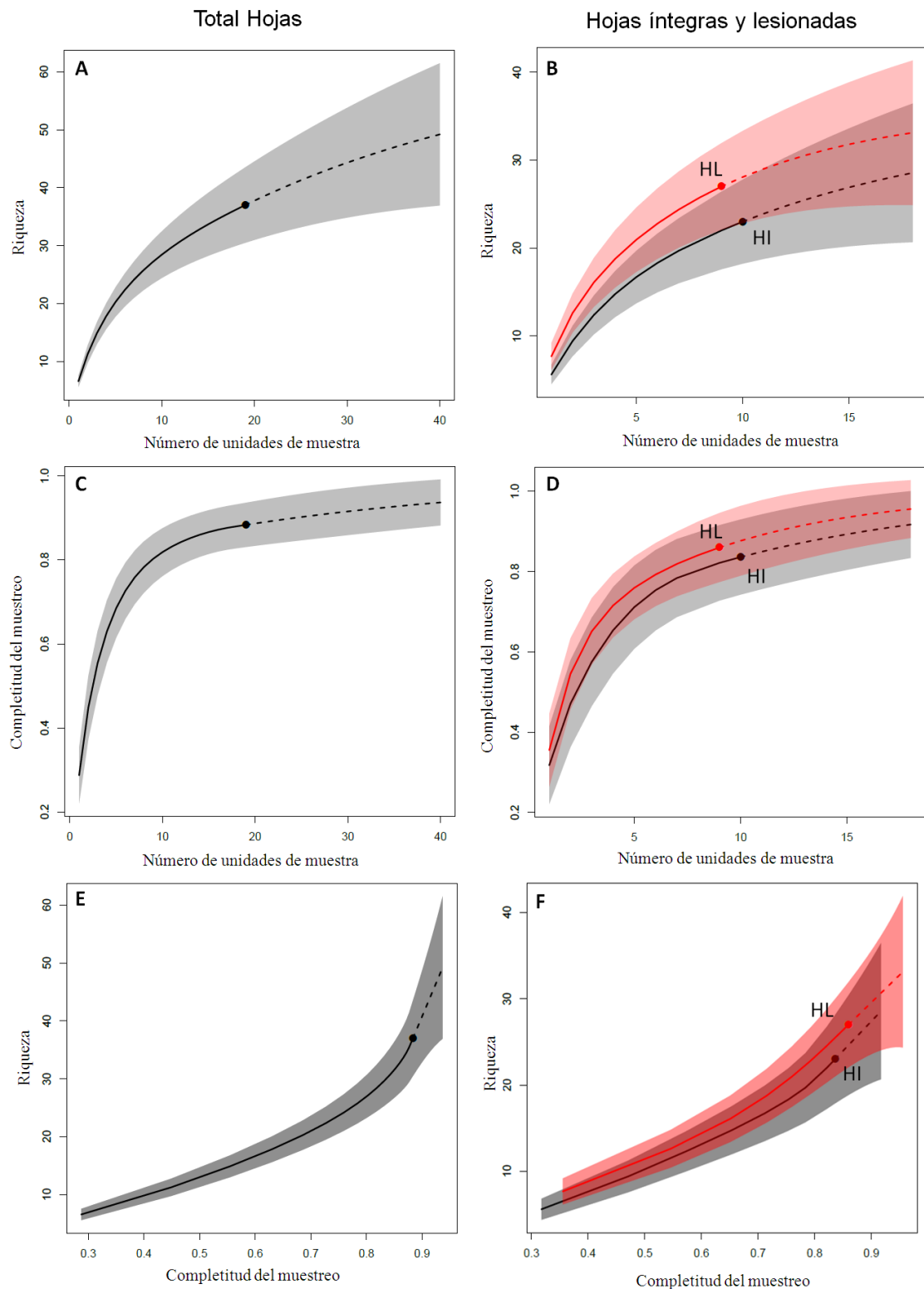
En este caso, el análisis multivariado ANOSIM, diseñado para determinar la pertinencia de las categorías definidas *a priori*, encontró que las comunidades de hojas íntegras y de hojas heridas fueron significativamente distintas ( $R = 0,33$ ,  $p = 0,0026$ ), aunque la magnitud de las diferencias no haya sido grande. Esto contradice los resultados obtenidos por el método indirecto. Sin embargo, el estimador de Chao-Sorensen coincidió en la similitud de ambas comunidades para las dos estrategias, encontrando que los subconjuntos de hoja íntegra y de hojas lesionada fueron muy similares sin llegar a ser iguales (Tabla 2). Además, el índice clásico de Sorensen aquí también arrojó valores que apuntarían a una moderada similitud entre ambos subconjuntos. En base al resultado obtenido por ANOSIM, pasarán a evaluarse por separado las comunidades de hoja íntegra y de hoja lesionada.

Considerándose de forma arbitraria como frecuentes aquellos taxones que aparecen entre un 50 y un 75% de las veces, y como muy frecuentes aquellos que aparecen en más del 75% de las cámaras húmedas, se puede observar entonces que en el conjunto total, y en el correspondiente a hojas íntegras, solo *Beltraniella portoricensis* fue muy frecuente y *Pestalotiopsis guepinii* fue frecuente. En cambio, para las hojas con lesión el panorama fue un tanto diferente al ser *Dactylaria eucalypti* la única especie muy frecuente, coexistiendo con otras cuatro especies frecuentes, *Mycoleptodiscus* sp., *Beltraniella portoricensis*, *Pestalotiopsis guepinii* y *Alternaria alternata*. Además, según el análisis multivariado SIMPER, las dos especies que más contribuyeron a las diferencias entre las comunidades de hojas íntegras y las de hojas heridas fueron *Dactylaria eucalypti* y *Mycoleptodiscus* sp. (ver Tabla V.2 del Anexo V).

## **2.2. Análisis de la diversidad**

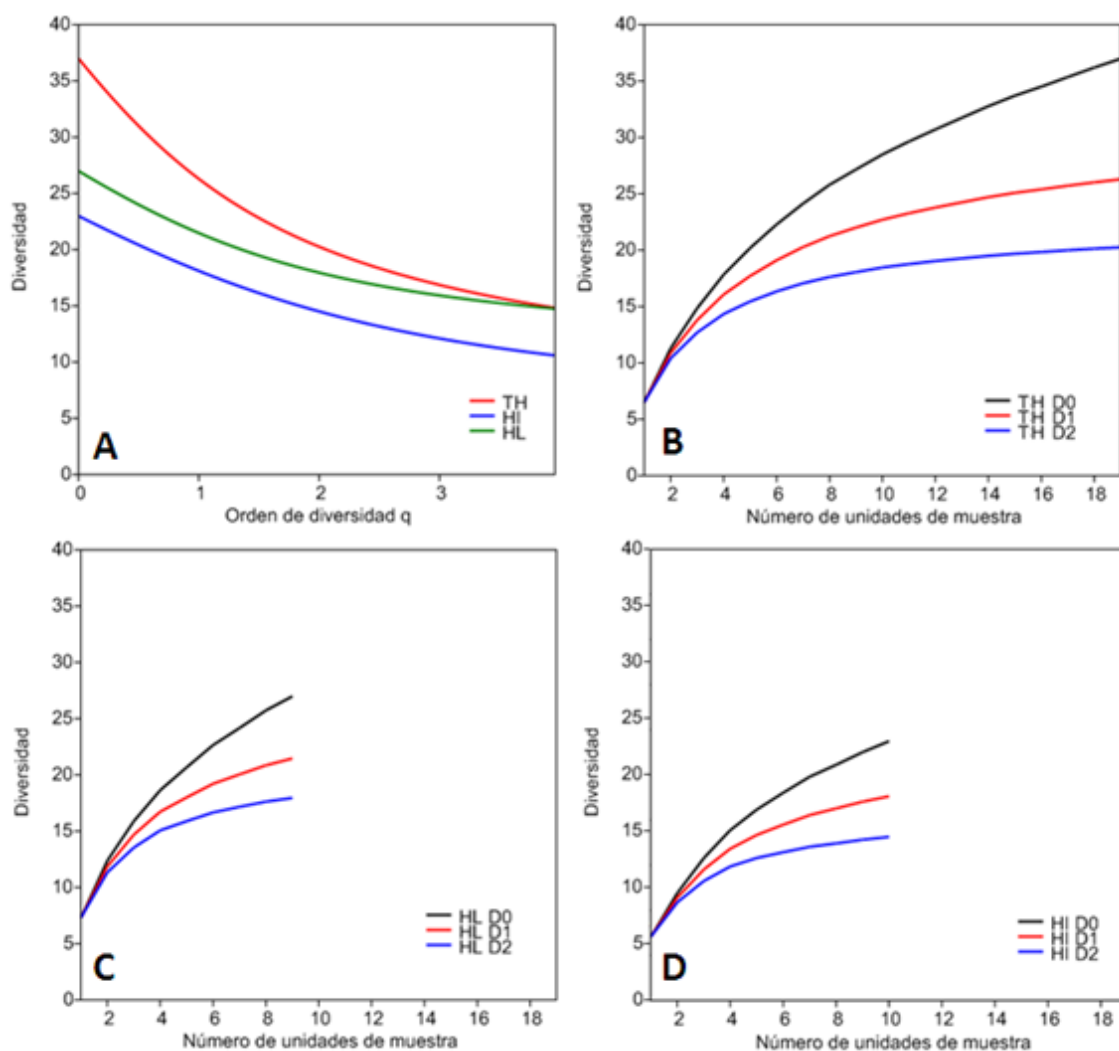
### 2.2.1. Diversidad de orden cero

Tanto la riqueza observada como las estimaciones dadas por Chao2 y Jackknife2 para las comunidades obtenidas por el método directo se exponen en la Tabla 3. En este caso el desempeño de los estimadores fue bastante pobre, al no lograr ninguno de ellos estabilizarse para el conjunto total de hojas, ni para los subconjuntos de hojas íntegras y lesionadas (ver Figura V.2 del Anexo V). Esto significa que el valor estimado de la riqueza seguiría aumentando si se agregaran más unidades muestrales (i.e. cámaras húmedas). Por lo tanto, ninguno de los estimadores fue muy informativo.



**Figura 10. Rarefacción y extrapolación de la riqueza de las comunidades obtenidas por el método directo.** A la izquierda, para el conjunto total de hojas (**A**, **C** y **E**) y, a la derecha (**B**, **D** y **F**), para los subconjuntos de hojas íntegras (HI, línea negra e intervalo gris) y de hojas lesionadas (HL, líneas e intervalos rojos). Las líneas sólidas representan la rarefacción, las líneas punteadas la extrapolación, el punto grueso la muestra de referencia y las regiones coloreadas los intervalos de confianza del 95%. **A**) y **B**) riqueza en función del esfuerzo de muestreo; **C**) y **D**) relación entre la completitud y el esfuerzo de muestreo; **E**) y **F**) riqueza en función de la completitud del muestreo.

Dado que las muestras de referencia del conjunto total de hojas, así como de los subconjuntos, no lograron alcanzar una asíntota en las curvas de acumulación de las Figuras 10.A y 10.B, queda claro que el muestreo fue incompleto. De todas formas, en los tres casos el muestreo fue suficiente al tenerse en cuenta el criterio de suficiencia de Anne Chao. Luego, para los tres conjuntos la completitud rondó un valor cercano al 0,85 (Figuras 10.C y 10.D). Sin embargo, tanto el cálculo de la completitud como las extrapolaciones mostradas en todas las curvas de la Figura 10 se basan en la estimación no estable de la riqueza por Chao2. Por lo tanto, la completitud fue en alguna medida sobreestimada. En relación a los subconjuntos, no hubo diferencias significativas en la riqueza de hojas íntegras y hojas lesionadas como se puede apreciar por el gran solapamiento de los intervalos de confianza (Figura 10.B y F).



**Figura 11. Perfiles de diversidad y curvas de acumulación de las diversidades para las comunidades obtenidas por el método directo.** En A, perfiles de diversidad, donde: TH, total de hojas; HI, hojas íntegras; HL, hojas lesionadas. En B, C y D, curvas de acumulación de las diversidades  $D_0$ ,  $D_1$  y  $D_2$  para el total de hojas, para las hojas lesionadas y para las hojas íntegras, respectivamente. El alisamiento de estas curvas se logró al computarse 1000 aleatorizaciones.



### 2.2.2. Diversidad de orden superior

En la Tabla 3 se detallan las diversidades de distinto orden para las cámaras húmedas con hojas íntegras, hojas lesionadas y totales. Además, en la Figura 11.A se muestran los perfiles de diversidad donde puede constatarse, al no existir cruce alguno de los perfiles, que la diversidad de la comunidad fúngica de las hojas lesionadas es superior a la de las hojas íntegras. En este caso, la diversidad de orden uno ( $D_1$ ) parecería no asintotizarse, mientras que la diversidad de orden dos ( $D_2$ ) sí parecería hacerlo, tal y como se ve en las curvas de acumulación de las diversidades para el conjunto total y los subconjuntos (Figuras 10.B, 10.C y 10.D) En relación a la equidad, los perfiles de diversidad y el índice de equidad de Hill no mostraron grandes diferencias entre los conjuntos (Tabla 3).

### **3. CULTIVO VS. CÁMARA HÚMEDA**

Para comparar las comunidades obtenidas por el método directo y el indirecto se hizo uso del índice de similitud clásico de Sorensen que solo tiene en cuenta la información cualitativa. La información cuantitativa se desechó por las enormes diferencias en los procedimientos utilizados en cada metodología. De esta forma, teniendo en cuenta la presencia-ausencia de las especies en el conjunto total para cámara húmeda y en el total para cultivo, el índice de Sorensen da un valor de 0,31. Si se distingue el inventario de cultivo entre las especies asociadas a la lámina y las asociadas al pecíolo, se observa que el conjunto de lámina es más parecido a la comunidad de las cámaras húmedas que el conjunto de pecíolo (Sorensen lámina/cámara húmeda = 0,35; Sorensen pecíolo/cámara húmeda = 0,27).

A estas diferencias en relación a la composición de los inventarios también se suman las diferencias en las especies que aparecieron como más frecuentes. De todas ellas, solo *Pestalotiopsis guepinii* fue reconocida como muy frecuente para ambos métodos, tanto para las hojas íntegras y lesionadas del método directo, como para las láminas del método indirecto, pero no así para el pecíolo. Esto refuerza la idea de una mayor similitud entre las comunidades de las hojas de cámara húmeda y la de los segmentos de lámina, lo cual resulta lógico ya que las láminas representan la mayor superficie observable en las cámaras húmedas. Otra diferencia destacable es que en las cámaras húmedas aparecieron hongos reproduciéndose sexualmente, mientras que en cultivo todos los hongos que esporularon lo hicieron asexualmente. Los teleomorfos hallados en las cámaras húmedas fueron *Ceratocystis* sp., *Chaetomium funicula*, *Corynascus sepedonium* y *Sordaria fimicola*, siendo los tres últimos de los pocos Sordariales encontrados en este trabajo.

En términos de diversidades, la riqueza observada fue similar entre el conjunto total de hojas de cámara húmeda y el de segmentos de pecíolo, mientras que el conjunto de discos de lámina tuvo niveles de riqueza inferiores a ambos (Tabla 3). Por último, las comunidades obtenidas por el método directo resultaron ser más equitativas que aquellas registradas por cultivo, con valores de equidad de Hill más altos.

#### 4. SAPRÓTROFOS VS. ENDÓFITOS

La estrategia basada en el cultivo de este trabajo siguió el protocolo usado previamente por Tiscornia *et al.* (2012), quienes describieron las comunidades endófitas asociadas a lámina y pecíolo de *E. uruguayensis*. Esto permitió poder hacer comparaciones entre sus comunidades endofíticas con las comunidades saprotróficas aquí obtenidas. De todas formas, con la identificación de los aislamientos endófitos correspondientes a *Diaporthe* según el criterio de Gomes *et al.* (2013) (Figura 4), se modificó el inventario original descrito por Tiscornia *et al.* (2012) (ver Anexo VI).

Lo primero que se observó fue que el 33% de las 18 especies endófitas encontradas previamente aparecieron en el mantillo aquí estudiado. Éstas fueron *Beltrania rhombica*, *Cladosporium cladosporioides*, *Diaporthe infecunda*, *Diaporthe* sp. 2 y *Diaporthe oxe*. Aunque, en este último caso, el análisis filogenético parecería revelar que se trata de cepas distintas (Figura 4). Todas estas especies vieron menguadas sus frecuencias de incidencia en el mantillo, excepto *C. cladosporioides*. Si se tiene en cuenta además la estrategia de cámaras húmedas se suma también *Colletotrichum gloeosporioides* a las especies compartidas.

A pesar de estar presentes en el mantillo, los endófitos no parecieron ser parte importante de la comunidad saprotrófica temprana. Su proporción relativa en la comunidad saprotrófica (*sensu* Osono, 2006) nunca superó el 1% del total de hongos presentes en el mantillo. Además, el estimador de Chao-Sorensen, que subsana los efectos del submuestreo, fue bastante coincidente al arrojar en todos los casos similitudes inferiores al 12% (Tabla 2). Algo similar sucedió con el índice clásico de Sorensen. Otro dato interesante es que las diferencias entre las comunidades de lámina y pecíolo fueron más marcadas entre saprótrofos que entre endófitos (Tabla 2).

En relación a la diversidad de las comunidades, tanto las curvas de acumulación como los perfiles de diversidad muestran cómo las comunidades de endófitos son mucho menos diversas que las de saprótrofos (Figuras 7.C y 8.A). De hecho, si se tiene en cuenta la diversidad de orden uno de las distintas comunidades, también llamada exponencial del índice de

Shannon, se puede ver que la comunidad saprótropa de pecíolo es casi seis veces más diversa que la endófito, y que la comunidad saprótropa de lámina es dos veces más diversa que la endófito (Tabla 3). Además, queda patente cómo se invierten las diversidades de hongos asociados a los distintos órganos luego de la abscisión, ya que la lámina era significativamente más diversa que el pecíolo entre los endófitos, mientras que el pecíolo es más diverso que la lámina entre los saprótropos (Figuras 7.C y 8.A). Quizás lo único que permaneció incambiado luego de la abscisión fue la equidad de las comunidades (Tabla 3).

## DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo realizado en el país que se dedica al estudio de la diversidad de hongos asociados al mantillo foliar. En especial, se estudió la comunidad de hongos filamentosos asociados a las hojas recién caídas del guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*), para lo cual se hizo uso de dos estrategias de muestreo y relevamiento, una directa basada en cámaras húmedas y otra indirecta basada en el cultivo. Además, se estudió la influencia del tipo de sustrato en la estructuración comunitaria, agrupando las hojas en función de su integridad y analizando por separado la lámina del pecíolo. También se intentó vincular las comunidades saprotróficas obtenidas con las comunidades endófitas de hojas descritas en un trabajo previo realizado por Tiscornia *et al.* (2012). Todo esto permitió no solo describir la comunidad fúngica de las hojas recién caídas del guayabo blanco sino también confirmar las observaciones de otros autores y generar nuevas hipótesis.

### **1. Utilidad de las herramientas utilizadas para el análisis de la diversidad**

El análisis estadístico de la diversidad se encuentra en evolución constante y resulta de interés aplicar las nuevas herramientas que van surgiendo al estudio de las comunidades fúngicas. En este sentido, algunas herramientas como la estimación no paramétrica de la riqueza, el ajuste a modelos de distribución de abundancias, los índices de similitud, el análisis de similitudes (ANOSIM) y el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) ya han sido ampliamente usados en la literatura para caracterizar diversas comunidades fúngicas (e.g. Arnold *et al.*, 2001; Neubert *et al.*, 2006; Paulus *et al.*, 2006; Hoffman & Arnold, 2008; Unterseher *et al.*, 2008; Dumbrell *et al.*, 2010; Schechter & Bruns, 2012; Unterseher *et al.*, 2013). Sin embargo, otras herramientas han sido escasamente aprovechadas, como es el caso de los Números de Hill (e.g. Espinosa-García & Langenheim, 1990), mientras que para otras, como la estimación de la similitud o las curvas de acumulación que integren la rarefacción y la extrapolación, este parecería haber sido el primer trabajo que las aplicó al estudio de comunidades fúngicas.

La diversidad alfa de las comunidades estudiadas para cada una de las categorías analizadas por ambas técnicas fue descrita a partir de los Números de Hill. Entre los descriptores expuestos, la diversidad de orden uno, o exponencial del índice de Shannon, aunque es considerada la más apropiada por ponderar cada especie por su frecuencia exacta en la comunidad (Jost, 2006), no logró asintotizarse en todos los casos. En cambio, la diversidad de orden dos, o inverso del índice de Gini-Simpson, sí logró asintotizarse para todas las categorías analizadas, por lo que podría ser un buen descriptor de la diversidad para las comunidades

fúngicas del mantillo y otras comunidades microbianas híper-diversas. De hecho, se ha demostrado que la influencia del muestreo es mayor cuanto menor es el orden de diversidad, al punto de ser la riqueza la que encuentra mayor dificultad para asintotizarse (Chao *et al.*, 2014). En este sentido, la comparación de perfiles de diversidad, aunque resultó ilustrativa, pierde exactitud a órdenes de diversidad bajos. En definitiva, las propiedades inherentes a los Números de Hill, considerados verdaderas diversidades, los convierten en descriptores intuitivos en contraposición a los viejos índices como el de Shannon o el de Simpson (Jost, 2006; Tuomisto, 2010; Leinster & Cobbold, 2012), por lo que su uso es de esperar que se popularice en el estudio de comunidades fúngicas.

Para paliar los efectos del submuestreo se han desarrollado recientemente formas de extrapolar las diversidades de orden uno y orden dos (Chao *et al.*, 2014) que no fueron puestas en práctica en este trabajo. Sin embargo, para el caso de la riqueza sí se probaron tres estimadores no paramétricos: Chao2, Jackknife2 e ICE. En las categorías de la técnica basada en el cultivo, los estimadores ICE y Chao2 lograron estabilizarse, mientras que Jackknife2 tuvo mayores dificultades. Para la técnica basada en cámaras húmedas ninguno de los estimadores logró estabilizarse debido seguramente al bajo número de réplicas. En la literatura Chao2 es el estimador más comúnmente encontrado y ha sido propuesto como el estimador más adecuado para estudios de comunidades fúngicas (Hughes *et al.*, 2001; Unterseher *et al.*, 2008). Sin embargo, se suele considerar que las estimaciones arrojadas por Chao2 son en realidad pisos de estimación (Magurran, 2004). En este sentido, ICE, aunque menos popular, podría arrojar estimaciones más cercanas a la realidad. Además, muchos autores hacen notar que los intervalos de confianza de la estimación por Chao2 suelen ser demasiado amplios, quitándole precisión al estimador (Magurran, 2004; Soutullo, 2006; Unterseher *et al.*, 2013). A pesar de todo esto, se ha sugerido que, aunque se pueda poner en duda la fidelidad de las estimaciones de la riqueza, la comparación de la diversidad relativa entre comunidades puede hacerse con rigurosidad (Hughes *et al.*, 2001).

Para el estudio del grado de heterogeneidad existente entre las comunidades estudiadas, o diversidad beta, el uso del estimador de similitud de Chao-Sorensen resultó ser el más apropiado por tener en cuenta las especies no vistas y compensar entonces los efectos del submuestreo. Fue particularmente útil para comparar comunidades analizadas siguiendo un mismo protocolo. Los análisis multivariados, ANOSIM y SIMPER, también arrojaron información valiosa a pesar de basarse en un índice pensado para datos de abundancias como el de Bray-Curtis. De todas formas, su uso ha sido recomendado para datos de presencia-

ausencia y son varios los trabajos que lo aplican a este tipo de datos (e.g. Jewett *et al.*, 2005; Rees *et al.*, 2005; Buschbaum *et al.*, 2006).

## **2. Efecto de la estrategia de muestreo en el relevamiento de la comunidad fúngica**

En este trabajo, las dos técnicas utilizadas muestrearon de diferente forma las hojas y eso llevó a que existieran ventajas e inconvenientes a la hora de interpretar los resultados. Para el método indirecto, basado en el cultivo, se utilizaron muchas unidades muestrales de pequeño tamaño, que consistieron en un disco de lámina y un segmento de pecíolo por hoja. Un gran inconveniente de esta técnica fue la necesidad de interpretar los resultados para cada uno de los órganos por separado. De haberse integrado ambos conjuntos se habría incurrido en el uso de pseudoréplicas que empañarían los resultados. Otro inconveniente es la escasa información que proveyó cada segmento o disco en términos de especies. Esto hizo que se hiciera necesario condensar la información de grupos de unidades muestrales para poder realizar análisis multivariados como ANOSIM y SIMPER. De todas formas, la gran cantidad de réplicas permitió en este caso obtener estimaciones estables de la riqueza y, por lo tanto, informativas. En cambio, para la técnica directa se utilizó una estrategia completamente distinta de pocas pero grandes unidades muestrales, donde cada una de ellas estuvo representada por dos hojas. En este caso los resultados sí se pudieron interpretar para las hojas como un todo, pero la poca cantidad de réplicas dificultó la estimación de la riqueza.

El muestreo realizado para ambas técnicas demostró ser incompleto, algo que se ve reflejado en las curvas de acumulación de especies que no lograron asintotizarse, pero resultó ser suficiente y, por lo menos para las muestras de referencia de la técnica de cultivo, alcanzó niveles de completitud más que aceptables. Por lo tanto, se podría considerar que ambas técnicas permitieron representar lo suficientemente bien la comunidad fúngica de este mantillo. A pesar de esto, los inventarios obtenidos para las dos metodologías resultaron ser poco similares entre sí. Esta inconsistencia refuerza la idea ya propuesta de que el uso combinado de protocolos permite registrar las comunidades fúngicas del mantillo de forma más completa que si solo se intensificara el muestreo para un protocolo dado (Polishook *et al.*, 1996; Cannon & Sutton, 2004). Sobre todo porque se ha visto que para comunidades híper-diversas como la de los hongos del mantillo es prácticamente imposible obtener curvas de acumulación que se asintoticen y, por lo tanto, inventarios completos para una técnica dada (Hughes *et al.*, 2001).

Al unificarse entonces ambos inventarios, se obtiene un total de 77 taxones distintos, la mayoría de los cuales fueron anamorfos pertenecientes a Ascomycota. Esta riqueza es

congruente con el número de taxones generalmente encontrados para otras hojarascas, según una revisión bibliográfica realizada por Cannon & Sutton (2004). Estos autores estiman en base a dicha revisión que existe del orden de 100 especies fúngicas asociadas al mantillo de toda especie vegetal. Es muy probable que de haberse estudiado en este trabajo otros estadios más tardíos de la descomposición esa cifra se hubiera alcanzado. Por otra parte, la riqueza y sus estimaciones aquí obtenidas reflejan solamente la diversidad fúngica asociada a las hojas recién caídas de guayabos blancos del parque natural Parador Tajés a principios de otoño. Está claro que la diversidad de hongos asociada a la hojarasca recién formada del guayabo blanco en términos generales es seguramente mayor a la aquí encontrada y estimada, ya que se ha demostrado la existencia de una cierta heterogeneidad espacio-temporal en la estructura de las comunidades asociadas a un mantillo en particular (Polishook *et al.*, 1996; Paulus *et al.*, 2006).

Retomando las diferencias encontradas en los inventarios obtenidos por ambas técnicas, cabe preguntarse a qué se deben dichas diferencias, partiendo de la base de que se muestreó una misma comunidad. En general, las diferencias suelen atribuirse a ciertas particularidades inherentes a cada una de las técnicas. Así, por ejemplo, la técnica basada en el cultivo sesga el inventario a favor de las especies de rápido crecimiento, mientras que la técnica basada en cámaras húmedas lo sesga a favor de las especies capaces de esporular (Cannon & Sutton, 2004). Sin embargo, otros factores también pueden estar contribuyendo a las diferencias en los resultados. Por ejemplo, una vez que las hojas son incubadas en las cámaras húmedas, los hongos que caracterizan la comunidad de las hojas recién caídas comienzan a invadir el sustrato y a competir entre ellos por los recursos limitados. Las interacciones antagónicas que ocurrirían muy probablemente durante el mes de incubación podrían llevar entonces a la pérdida de muchas especies y, por lo tanto, a la subestimación de la diversidad en términos de riqueza. Además, las frecuencias relativas de las distintas especies fúngicas según este método directo no tienen por qué reflejar las proporciones originales al momento de la recolección de las hojas. Durante la incubación, seguramente ocurra una modificación sustancial del sustrato, perdiéndose compuestos tóxicos para los hongos como los compuestos fenólicos, entre otros cambios químicos (Paulus, 2004; Berg & McLaugherty, 2008). Esto permitiría el avance de los saprótrofos secundarios cuyo inóculo, aunque presente, estaría inhibido al comienzo. Así pues, algunos hongos como *Beltraniella portoricensis*, *Wiesneriomyces laurinus* o *Dictyochaeta assamica*, que suelen ser considerados verdaderos hongos del mantillo (Shanthi & Vittal, 2010), aparecen testimonialmente en el inventario de cultivo, o ni siquiera aparecen, mientras que en las cámaras húmedas se encuentran entre las especies más dominantes.

Todo esto no solo explica las diferencias entre los inventarios, sino que hace suponer que la estrategia basada en el cultivo, aunque sesgada, resulta ser más fidedigna como fotografía de la comunidad en un punto dado de la sucesión de un mantillo. La estrategia basada en cámaras húmedas, en cambio, brindaría una representación distorsionada, donde las frecuencias relativas de las especies podrían no ser representativas de la estructura comunitaria original. De todos modos, la sucesión artificial que ocurre en las cámaras húmedas permite presumir cuáles de las especies que se encontraban en las hojas recién caídas podrían ser buenas competidoras en estadios más avanzados de la descomposición. En este sentido, llama la atención cómo *Pestalotiopsis guepinii*, la especie dominante de los segmentos de lámina, logra mantenerse en las cámaras húmedas, a pesar del fuerte avance de otros hongos como *Beltraniella portoricensis*. En cambio, otras especies muy frecuentes en el inventario de cultivo, como una *Phoma* o distintos *Diaporthe* y *Fusarium*, ven menguada su dominancia o incluso desaparecen con el transcurso de la incubación en las cámaras húmedas.

Aunque los inconvenientes de una técnica pudieran ser subsanados por la otra, quizás un muestreo un tanto distinto habría sido conveniente. Por ejemplo, para las cámaras húmedas, la unidad muestral podría consistir en una sola hoja, de manera de aumentar el número de réplicas. También podría ser conveniente acortar los tiempos de incubación, aunque eso traería aparejado que se pasen por alto muchos hongos que se toman su tiempo para esporular, a pesar de estar invadiendo activamente las hojas (Fryar, 2002). En cambio, para la técnica basada en el cultivo se podría realizar un muestreo repetitivo que consista en un conjunto de segmentos representativos de una misma hoja, de manera de aumentar la información por unidad de muestra (Magurran, 2004).

### **3. Importancia de las especies raras**

En el apartado anterior se han mencionado las especies dominantes de las comunidades fúngicas descritas para el mantillo en estadios iniciales de descomposición del guayabo blanco. Queda implícito que estas especies son las que compiten más exitosamente en el sustrato y que, por lo tanto, estarían bien adaptadas a vivir en él. Ahora bien, qué tan relevantes son las especies que aparecen con poca frecuencia es algo que hasta ahora se discute (Magurran & Henderson, 2003; Magurran, 2007).

En general los ecólogos suelen separar las especies de una comunidad en dos categorías, las persistentes y las ocasionales o raras, según qué tan frecuentes son en la comunidad (Magurran, 2004). El punto de corte es arbitrario, pero algunos autores proponen considerar como raras a aquellas especies que aparecen una sola vez en el muestreo (i.e. *únicos*)



(Magurran, 2004). Si se tiene en cuenta las comunidades de lámina y pecíolo obtenidas por la técnica de cultivo, se puede constatar que se encontraron en total 28 *únicos*, una porción importante de las 52 especies encontradas para esta técnica. Dado que el muestreo en todos los casos fue considerado suficiente, con niveles de completitud bastante satisfactorios, cabe pensar que estos *únicos* representan especies genuinamente raras y no especies persistentes submuestreadas. Además, el ajuste al modelo de distribución de serie log, más que al log normal, es indicativo del gran peso que tienen las especies infrecuentes en las comunidades aquí estudiadas. Por otro lado, las especies aquí consideradas como frecuentes nunca superaron el 23% de frecuencia de aparición, por lo que ninguna tuvo un marcado dominio de la comunidad.

Ahora bien, lo importante de la distinción entre especies raras y persistentes es su significado biológico. En este sentido, se ha propuesto que las abundancias de las especies persistentes estarían moldeadas por procesos biológicos, mientras que las especies raras se encontrarían allí por azar, debido a procesos neutrales de dispersión aleatoria (Magurran & Henderson, 2003; Magurran, 2007). Además, se ha sugerido que las especies raras serían abundantes en otro tipo de hábitats, encontrándose accidentalmente en el hábitat estudiado para el cual no estarían especialmente adaptadas (Magurran, 2004; Magurran, 2007). Algo similar ha sido observado para los hongos patógenos de plantas y se ha dado a conocer por Crous & Groenewald (2005) como la hipótesis del “pogo saltarín”. Los autores la explican de la siguiente forma: “los hongos patógenos de plantas, específicos de hospedero, con frecuencia exhiben la capacidad de colonizar tejidos no hospederos u otros sustratos, formando cuerpos fructíferos que producirán una cantidad limitada de propágulos, lo que les permite dispersarse aún más, en un intento de encontrar el hospedero para el cual son patógenos”. Esta hipótesis podría extenderse perfectamente a los hongos saprótrofos del mantillo dado que sus preferencias de hospedero son aún más laxas, hablándose de recurrencia de hospedero y no de especificidad (Zhou & Hyde, 2001). Por lo tanto, es probable que muchos de los *únicos* aquí encontrados sean especies adaptadas a colonizar otro tipo de sustratos, encontrándose por azar en las hojas del guayabo blanco. De todas formas, si estas especies infrecuentes lograran esporular, aunque sea mínimamente, en este sustrato presuntamente desfavorable, estarían potenciando su capacidad de dispersión, aumentando las chances de encontrar el sustrato para el cual estarían mejor adaptadas.

Sin embargo, también se ha sugerido que de alterarse lo suficiente las condiciones ambientales sería muy probable que surjan nuevas especies persistentes que reemplacen las ya existentes a partir del *pool* de especies raras (Magurran & Henderson, 2003). En este caso,

dado que el sustrato se va modificando a medida que progresa la descomposición, sería de esperar que algunos de los *únicos* encontrados en las hojas recién caídas pudieran estar allí, no para esporular mínimamente y así favorecer su dispersión, sino para participar activamente en la sucesión, tornándose dominantes en etapas posteriores del proceso de descomposición o cuando las condiciones ambientales cambian.

#### **4. Influencia del tipo de tejido en el ensamblado comunitario**

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que existen diferencias tanto en la composición, como en la diversidad y en la distribución de abundancias entre las comunidades de hongos saprótrofos que colonizan las láminas y los pecíolos de las hojas del guayabo blanco, al menos en los estadios tempranos de la descomposición. Otros trabajos también encontraron diferencias entre las comunidades saprótrofas de lámina y pecíolo (Hyde & Alias, 2000; Yanna *et al.*, 2001b; Paulus, 2004; Hyde *et al.*, 2007; Piruan *et al.*, 2007). Sin embargo, para las comunidades endófitas del guayabo blanco no existieron mayores diferencias en la composición pero sí en la diversidad, encontrando que la lámina fue significativamente más diversa que el pecíolo (Tiscornia *et al.*, 2012). En cambio, en este trabajo se encontró la relación inversa, estimándose que la comunidad del pecíolo fue dos veces más rica en especies que la de la lámina.

Algunos autores atribuyeron las diferencias entre las comunidades de lámina y pecíolo a las preferencias de tejido que pudieran tener los hongos (Paulus, 2004; Hyde *et al.*, 2007; Piruan *et al.*, 2007), dado que ambas partes foliares poseen una histología lo suficientemente distinta como para representar micro-hábitats diferentes. En particular, los pecíolos, formados mayormente por tejidos vasculares y de sostén, ambos con gruesas paredes celulares lignificadas, tendrían un mayor valor nutritivo y una mayor capacidad de retención de la humedad que las láminas, promoviendo el establecimiento de comunidades más cuantiosas y estables. En cambio, los tejidos parenquimáticos de finas paredes no lignificadas, que forman gran parte de las láminas, no serían tan nutritivos luego de agotarse los compuestos carbonados simples y el almidón. Además, se secarían más rápidamente por lo que, luego del desarrollo de los hongos del azúcar, la comunidad se empobrecería respecto a la del pecíolo (Piruan *et al.*, 2007).

Aunque para el guayabo blanco no se ha encontrado información específica sobre su histología foliar, las descripciones de los rasgos histológicos comunes al género *Eugenia* concuerdan con las características ya mencionadas de las láminas y los pecíolos, pero suman además otros datos relevantes (Armstrong *et al.*, 2012; Da Silva & Silva, 2012). Por ejemplo, las

hojas suelen ser hipostomáticas y suelen estar provistas de gruesas cutículas, lo que dificultaría la colonización fúngica (Gutschick, 1999). Por otra parte, la presencia de idioblastos secretores de compuestos fenólicos en las láminas (Armstrong *et al.*, 2012; Da Silva & Silva, 2012) podría ser un factor que determine la menor diversidad fúngica en ellas, ya que dichos compuestos tienen un papel importante en las defensas de las plantas (Lattanzio *et al.*, 2006). De hecho, se ha encontrado una correlación negativa entre la riqueza fúngica en un mantillo y la concentración de compuestos fenólicos presentes en las hojas vivas, los cuales se supone persisten por un determinado tiempo en el proceso de descomposición (Paulus, 2004). Otra característica de las láminas, no solo de *Eugenia* sino de las Myrtaceae, es la presencia de gran cantidad de cavidades secretoras llenas de aceites esenciales (Armstrong *et al.*, 2012; Da Silva & Silva, 2012) que también podrían influir en las preferencias de tejido de los hongos.

Sin embargo, esta visión basada en las preferencias de tejido no es la única explicación que se podría dar a la mayor riqueza de hongos en los pecíolos en descomposición. Otra explicación posible es que el progreso de la descomposición se desdoble, comenzando antes para el pecíolo que para la lámina debido a las características del proceso mismo de abscisión. Éste es un proceso fisiológico, programado por las plantas para perder sus órganos como hojas, flores y frutos sin dejarle al vástago heridas expuestas. En el caso de las hojas, cuando las láminas pierden vigor, ya sea por lesiones o por senescencia, se desencadena la abscisión en una capa de células en la base del pecíolo. Allí, se degrada enzimáticamente la laminilla media que cementa las células y se debilitan las paredes celulares primarias de éstas, provocando la separación. Del lado proximal a la planta, se forma una capa protectora suberosa que se desarrolla en una peridermis continua con la de la rama, y del lado de la hoja se deposita cierta cantidad de lignina, sin desarrollarse una verdadera capa protectora. Luego, la hoja queda sostenida por sus haces vasculares por un tiempo, hasta que cae por su propio peso o por la acción del viento (Poovaiah, 1974; Addicott, 1982). Se podría sugerir entonces que, al no desarrollarse una verdadera capa protectora del lado de la hoja, el pecíolo quedaría expuesto, progresando allí la colonización fúngica de forma más rápida. Esto no solo explicaría una mayor riqueza fúngica para el pecíolo, sino también el nivel de colonización observado, que no solo fue muy superior al de las láminas, sino que fue casi total, al encontrarse por lo menos un hongo en prácticamente todos los segmentos (Figura 9).

## **5. Influencia de la integridad de las hojas en el ensamblado comunitario**

Además de estudiar cómo las distintas partes foliares influyen en el ensamblado comunitario, también se estudió la influencia de la integridad de las hojas en el establecimiento de las

comunidades fúngicas. En el caso de la estrategia de relevamiento de hongos por cultivo no se registraron diferencias significativas entre las comunidades de hojas íntegras y lesionadas. En cambio, para la estrategia de cámaras húmedas sí se encontró una diferencia significativa, aunque pequeña. Quizás esta aparente inconsistencia guarde relación con las diferencias en el diseño de muestreo. Para el relevamiento por cultivo, los segmentos de lámina utilizados no tenían por qué encontrarse aledaños a las heridas. Esto implicó que para registrarse alguna diferencia entre las comunidades representativas de hojas íntegras y hojas lesionadas, los hongos que penetraran por esas heridas tendrían que haberse desarrollado lo suficiente para alcanzar las porciones muestreadas. Evidentemente eso no ocurrió, quizás debido a que las defensas de la planta, todavía presentes, logran restringir la invasión fúngica de los tejidos. Sin embargo, un dato que llamó la atención fue el nivel de colonización fúngica bastante superior en los segmentos de hojas heridas respecto a los de hojas íntegras (Figura 9.A). Aunque *a priori* parece lógico que las hojas lesionadas alberguen más hongos, ya fue mencionado que a partir de esta técnica no se registraron grandes diferencias ni en la composición, ni en la riqueza, ni en las proporciones de especies dominantes y raras. Por lo tanto, ningún hongo en particular puede explicar semejantes diferencias. Una posible explicación es que las heridas debiliten lo suficiente a las hojas como para desplazar a favor de los hongos el equilibrio antagónico existente entre éstos y las defensas remanentes de la hoja, de manera que toda la comunidad fúngica allí presente acelere el proceso de invasión de los tejidos. De hecho, es sabido que las lesiones inducen el proceso de senescencia, siempre previo a la abscisión (Addicott, 1982), y que cuanto más maduras están las hojas, más densamente colonizadas se encuentran (Kumaresan & Suryanarayanan, 2002; Suryanarayanan & Thennarasan, 2004; Guo *et al.*, 2008).

En cambio, en las cámaras húmedas, los hongos que hubieran penetrado las hojas a través de las lesiones tendrían la oportunidad de desarrollarse y competir con el resto de los hongos durante el período de incubación. Esto permitió encontrar dos especies claramente asociadas a las hojas lesionadas, *Mycoleptodiscus* sp. y *Dactylaria eucalypti*, cuya introducción alteró además el esquema de especies dominantes de la comunidad. Estas especies saprótrofas parecerían entonces estar especialmente adaptadas a penetrar las hojas del guayabo blanco por sus lesiones. Una explicación posible es que sean transportadas específicamente por los insectos herbívoros que, al consumir estas hojas, causarían las lesiones observadas. Esto no sería novedoso si se tiene en cuenta que muchos hongos patógenos de plantas leñosas utilizan a los insectos como vectores para su diseminación (Webber & Gibbs, 1989).

## 6. Vinculación con las comunidades endófitas

La comparación de las comunidades de hongos saprótrofos asociados a las hojas recién caídas con las comunidades endófitas de hojas vivas descritas por Tiscornia *et al.* (2012) se basó en la recolección del material en un mismo sitio y en el uso de un mismo protocolo de muestreo basado en el cultivo. Lo que se observó al ser comparadas ambas comunidades fue, en primer lugar, una diversidad sustancialmente mayor de las comunidades saprótrofas respecto de las endófitas, aumentando seis veces la diversidad fúngica en los pecíolos y duplicándose en las láminas. Luego, se observó que ambas comunidades fueron muy poco similares en su estructura y composición, incluso al tenerse en cuenta las especies compartidas no vistas mediante el estimador de similitud de Chao-Sorensen. Si además se suma que la proporción relativa de endófitos (*sensu* Osono, 2006) en la comunidad saprotrófica temprana fue del uno por ciento, se podría llegar a sugerir que los endófitos del guayabo blanco no participarían de manera significativa en la descomposición de las hojas. De ser así, este sería el trabajo con menos implicación de los endófitos en el mantillo cuando se lo compara con la revisión bibliográfica realizada por Osono en 2006. Sin embargo, esta conclusión es demasiado arriesgada teniendo en cuenta que existió una distancia temporal de dos años en el muestreo de ambos trabajos. Aunque se considere que cada especie arbórea alberga una comunidad endofítica característica (Stone *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2012) y relativamente estable (Guo *et al.*, 2008), no sería de extrañar que ocurran ciertos cambios en la estructura comunitaria con el paso de los años, ya sea, a modo de ejemplo, por variaciones en la pluviosidad, por cambios en el estado de salud del árbol o por la misma deriva ecológica.

Si desde la óptica de la comunidad saprotrófica de 52 especies las coincidencias con la comunidad endofítica parecerían ser escasas, para la comunidad endofítica esas mismas coincidencias representan un 33% de sus 18 especies. En principio esto sugiere la posibilidad de que muchos de esos hongos endófitos logren completar sus ciclos vitales reproduciéndose en la hojarasca (Osono, 2006). Las especies que habrían logrado permanecer en las hojas del guayabo blanco luego de su abscisión fueron: *Beltrania rhombica*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe infecunda*, *Diaporthe* sp.2 y *Diaporthe oxe*. En el caso de *D. oxe* se trató de cepas distintas y en los casos de *B. rhombica* y *C. cladosporioides* no se puede asegurar que los aislamientos endófitos y saprótrofos correspondan a las mismas cepas.

Además, otra especie que fue muy común en las láminas de hojas recién caídas fue *Pestalotiopsis guepinii*, que a pesar de no haber sido encontrada como endófita foliar, sí fue

hallada con mucha frecuencia en los frutos del guayabo blanco y, en menor medida, en la corteza de las ramas estudiados también por Tiscornia *et al.* (2012). Otro par de especies que aparecen aquí en la comunidad saprotrófica pero también como endófitas de corteza fueron *Bartalinia robillardoides* y *Paraconiothyrium fungicola*. Se podría pensar que tanto los frutos como la corteza podrían ser la fuente inicial de inóculo a partir de la cual estas especies se dispersan al mantillo foliar.

Un punto que merece la pena ser discutido es el relativo a los niveles similares de colonización encontrados en ambos trabajos, sobre todo en el caso de las láminas, donde se encontró el mismo porcentaje (69%). Esta observación es contraria a lo descrito en la literatura, donde generalmente se observa que con el avance del proceso de senescencia de las hojas, antes incluso de que ocurra la abscisión, aumentan los niveles de colonización fúngica de los tejidos (Kumaresan & Suryanarayanan, 2002; Suryanarayanan & Thennarasan, 2004; Guo *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha demostrado que los niveles de colonización de las hojas pre-abscisión se ven muy afectados por otros factores como la estacionalidad (Guo *et al.*, 2008). Por lo tanto, dada la distancia temporal de ambos muestreos, la similitud existente en los niveles de colonización de ambos trabajos no se tomó como un dato relevante.

## **7. El caso particular del género *Diaporthe***

El género *Diaporthe*, cuyo anamorfo es *Phomopsis*, se encuentra bien representado a nivel global, encontrándose especies patógenas, endófitas y saprótrofas. Su taxonomía es compleja y estuvo ligada a la creencia de que las especies de este género eran específicas de hospedero, habiéndose descrito casi 2000 especies (Gomes *et al.*, 2013). La necesidad de unificar los teleomorfos y anamorfos bajo un mismo nombre, sumado a que hoy se sabe que muchas de sus especies tienen rangos amplios de hospedero, fomentó la redefinición de sus fronteras. Así pues, en 2013, Gomes *et al.* analizaron molecularmente las cepas tipo disponibles en la colección CBS y otras tantas cepas halladas en Brasil, describiendo 95 especies con un criterio filogenético. Esta reorganización taxonómica permitió identificar los aislamientos de *Diaporthe* aquí encontrados, así como los *Diaporthe* endófitos encontrados por Tiscornia *et al.* (2012) mediante un análisis filogenético de sus secuencias ITS (Figura 4).

La elección del género *Diaporthe* para hacer un análisis más profundo no es trivial. Varias especies del género se asociaron a los tejidos tanto vivos como muertos del guayabo blanco, y algunas llegaron a dominar las comunidades fúngicas foliares (ver Tabla 1 y Anexo VI), por lo que se podría considerar que *Diaporthe* es un género particularmente adaptado a los tejidos foliares de esta planta. Esta asociación exitosa no se observa en otras Myrtáceas nativas, como

*Myrcianthes cissplatensis* y *Myrrhinium atropurpureum*, donde no aparecen especies de *Diaporthe* o aparecen pocas que, dadas sus bajas frecuencias de aparición, parecerían estar formando parte del *pool* de especies raras (Tiscornia & Bettucci, 2014). El éxito de las especies de este género en las hojas vivas y muertas del guayabo blanco podría estar relacionado con su forma de vida cuando se encuentran como endófitos. Se ha visto que algunas especies de *Diaporthe* endófitas se desarrollan en los tejidos vivos de plantas no herbáceas de forma sistémica, en contraste con la mayor parte de los hongos endófitos que suelen estar latentes con un crecimiento restringido (Bose, 1947; Stone *et al.*, 2004). Esto, no solo explicaría su alta frecuencia de incidencia en las hojas vivas, sino también su permanencia en las hojas recién caídas por un efecto fundador.

Aunque el análisis filogenético de las especies del género *Diaporthe* permitió encontrar claras vinculaciones entre los aislamientos endófitos obtenidos por Tiscornia *et al.* (2012) y los aislamientos saprótrofos aquí encontrados, las especies del género que dominaron cada comunidad fueron distintas, siendo *D. terebinthifolii* y *D. foeniculacea* predominantes en este estudio, y *D. infecunda* y *Diaporthe* sp. 2 predominantes entre los endófitos. Esto podría llegar a sugerir la existencia de una sucesión de especies de *Diaporthe* en el marco del proceso de descomposición foliar. Sin embargo, también es posible que haya ocurrido un recambio de las especies de *Diaporthe* endófitas en el transcurso de los dos años que separaron ambos relevamientos. Lo que sí queda claro es que las especies de este género que predominan en lámina son distintas de las que predominan en pecíolo, tanto antes como después del fenómeno de abscisión, algo que podría estar reflejando un fenómeno de partición de nichos. Además, al observarse las frecuencias de incidencia de estas especies en las comunidades endófitas y saprótrofas de ambos órganos, también queda claro que *Diaporthe* compite mejor en pecíolo que en lámina.

Finalmente, resulta interesante destacar que la mayor parte de las especies del género encontradas, como *D. infecunda*, *D. terebinthifolii*, *D. oxe* y *D. endophytica* parecen ser especies endémicas de esta región geográfica ya que solo han sido descritas como endófitas en plantas nativas medicinales del estado de Paraná, Brasil. No es de extrañarse esta vinculación entre *Diaporthe* uruguayas y brasileras asociadas a plantas nativas si se tiene en cuenta la hipótesis de que buena parte de la flora asentada en el país migró desde regiones como el estado de Santa Catalina en Brasil, aledaño al estado de Paraná (Legrand, 1968). Además, el análisis filogenético realizado también reveló que dos aislamientos aquí obtenidos representarían especies de *Diaporthe* que todavía no han sido descritas, pudiendo tratarse de especies endémicas o, en el mejor de los casos, de especies exclusivas del guayabo blanco. Estos

endemismos ponen de manifiesto, en primer lugar, la importancia de los factores biogeográficos en el ensamblado de las comunidades fúngicas y, luego, la persistencia exitosa de muchas especies fúngicas nativas frente a la entrada de especies fúngicas foráneas que vienen de la mano del intercambio florístico llevado a cabo por el hombre.



## CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la diversidad de hongos asociados al mantillo foliar del guayabo blanco en etapas tempranas de descomposición, haciendo uso de dos estrategias de relevamiento distintas, una directa y otra indirecta. Ambas técnicas permitieron obtener inventarios incompletos pero suficientemente representativos de la comunidad, que además resultaron ser bastante distintos y, por lo tanto, complementarios. Entre ambos se logró registrar una comunidad formada por 77 especies de hongos, en su mayoría anamorfos pertenecientes a Ascomycota. Se sugirió además que la técnica indirecta, basada en el cultivo, permitiría representar con mayor fidelidad la comunidad. De los resultados de esta técnica se desprende que ninguna especie tuvo un gran dominio de la comunidad, encontrándose muchas especies raras.

Se pretendió a su vez determinar el efecto de ciertas variaciones del sustrato foliar en la estructuración de la comunidad. En este sentido, se encontraron claras diferencias entre las comunidades asociadas a las láminas y a los pecíolos. Las especies más frecuentes de los pecíolos fueron *Diaporthe terebinthifolii*, *Phoma* sp., *Fusarium incarnatum* y *Fusarium sambucinum*, mientras que las láminas tuvieron solo a *Pestalotiopsis guepinii* como especie bastante frecuente. Además, se estimó que la comunidad de los pecíolos fue el doble de rica en especies que la comunidad de las láminas. Las diferencias en las características físicas y químicas, así como un progreso a destiempo de la descomposición para ambos órganos, estarían a la base de las diferencias observadas entre ambas comunidades. Por otro lado, el nivel de integridad de las hojas no pareció afectar mayormente la composición de la comunidad. Solo se pudieron identificar dos especies particularmente abundantes en las hojas lesionadas, *Dactylaria eucalypti* y *Mycoleptodiscus* sp., cuya presencia podría estar asociada al transporte mediado por los insectos herbívoros que causan las lesiones.

De la comparación de las comunidades saprotróficas aquí obtenidas con las comunidades endofíticas obtenidas por Tiscornia *et al.* (2012) para los guayabos blancos de la misma localidad surgió que casi un 33% de los endófitos foliares todavía podían encontrarse en las hojas recién caídas, donde podrían estar completando sus ciclos vitales. De todas formas, los hongos endófitos representaron una porción ínfima de la comunidad saprotrófica, por lo que *a priori* no tendrían un papel relevante en la descomposición de este mantillo. Sin embargo, no se puede descartar que la distancia temporal entre ambos muestreos haya afectado negativamente estas vinculaciones. También en este trabajo se constató un aumento sustancial de la diversidad fúngica, particularmente en los pecíolos.

Finalmente, distintas especies del género *Diaporthe* parecen asociarse con éxito a los tejidos vivos y muertos del guayabo blanco. En general, se observa una marcada preferencia por algún tipo de órgano foliar, lo que podría estar reflejando un fenómeno de partición de nichos entre las especies de este género. Además, el análisis filogenético de *Diaporthe* no solo reveló claras vinculaciones entre algunos aislamientos endófitos con los aquí obtenidos, sino que dejó en evidencia que existen en estas comunidades especies que todavía no han sido descritas, pudiendo tratarse de especies endémicas o de especies exclusivas del guayabo blanco. También puso en relieve la importancia de factores biogeográficos en el ensamblado de las comunidades fúngicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Addicott, F. T. (1982). *Abscission*. University of California Press.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Amend, A. S., Seifert, K. A., & Bruns, T. D. (2010). Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count?. *Molecular Ecology*, 19(24), 5555-5565.
- Armstrong, L., Duarte, M. D. R., & Miguel, O. G. (2012). Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(3), 475-481.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., & Gilbert, G. S. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, 105(12), 1502-1507.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. Cuarta edición. CRC press.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). Ecología microbiana: desarrollo histórico. En: *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Cuarta edición. Pearson Educación, 3-24.
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology: from individuals to ecosystems*.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B. A., ... & Crous, P. W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology*, 67, 1-94.
- Berg, B., & McLaugherty, C. (2008). *Plant litter: Decomposition, humus formation, carbon sequestration*. Segunda edición. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bettucci, L., & Roquebert, M. F. (1995). Microfungi from a tropical rain forest litter and soil: a preliminary study. *Nova Hedwigia*, v. 61(1-2), 111-118.
- 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.
- Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). Formulae for selected materials used to isolate and study fungi and fungal allies En: Mueller, G.M., Bills, G.F., & Foster, M.S (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, 595-618.
- Bills, G. F., & Polishook, J. D. (1994). Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia*, 187-198.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5,1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- Blackwell, M., Vilgalys, R., James, T.Y., & Taylor, J.W. (2012). *Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.* [Internet], versión del 30 de enero de 2012. En: The Tree of Life Web Project. Disponible desde: <http://tolweb.org/Fungi/2377/2012.01.30> [Acceso 16 diciembre 2014].
- Bose, S. R. (1947). Hereditary (seed-borne) symbiosis in *Casuarina equisetifolia* Forst. *Nature*, 159(4041), 512-4.

- Brussa, C. A., & Grela, I. A. (2007). *Flora arbórea del Uruguay con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. COFUSA, Mosca. Montevideo, Uruguay.
- Buschbaum, C., Chapman, A. S., & Saier, B. (2006). How an introduced seaweed can affect epibiota diversity in different coastal systems. *Marine Biology*, 148(4).
- Cannon, P. (1999). Options and constraints in rapid diversity analysis of fungi in natural ecosystems. *Fungal Diversity*, 2, 1-15.
- Cannon, P., & Sutton, B. (2004). Microfungi on wood and plant debris. En: Mueller, G.M., Bills, G.F., & Foster, M.S. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, 217-239.
- Carroll, G., & Petrini, O. (1983). Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia*, 53-63.
- Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93(12), 2533-2547.
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., & Shen, T. J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 8(2), 148-159.
- Chao, A., Gotelli, N. J., Hsieh, T. C., Sander, E. L., Ma, K. H., Colwell, R. K., & Ellison, A. M. (2014). Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs*, 84(1), 45-67.
- Christensen, M. (1981). Species diversity and dominance in fungal communities. En: Carroll, G.C., & Wicklow, D.T. (Eds.). *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem*. Primera edición. Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 201-232.
- Clarke, K. R., & Warwick, R. M. (2001). *Change in Marine Communities: An approach to statistical analysis and interpretation*. Segunda edición. PRIMER-E, Plymouth.
- Clay, K. (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 275-297.
- Colwell, R. K. (2013). EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples (EstimateS 9.1.0 y Guía de Usuario). Disponible en: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Colwell, R. K., Chao, A., Gotelli, N. J., Lin, S. Y., Mao, C. X., Chazdon, R. L., & Longino, J. T. (2012). Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology*, 5(1), 3-21.
- Cooke, R. C., & Rayner, A. D. (1984). *Ecology of saprotrophic fungi*. Longman.
- Cornejo, F. H., Varela, A., & Wright, S. J. (1994). Tropical forest litter decomposition under seasonal drought: nutrient release, fungi and bacteria. *Oikos*, 70, 183-190.
- Cowley, G.T. (1970). Effect of radiation on the microfungal populations of six litter species in the Luquillo Experimental Forest. En: Odum, H.T., & Pigeon, R.F. (Eds.). *A tropical rain forest: a study of irradiation and ecology at El Verde, Puerto Rico*. U.S. Atomic Energy Commission, Springfield, Virginia, F 25-8.

- Crous, P. W., & Groenewald, J. Z. (2005). Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australasian Plant Pathology*, 34(4), 463-470.
- Crowther, T. W., Boddy, L., & Jones, T. H. (2011). Outcomes of fungal interactions are determined by soil invertebrate grazers. *Ecology Letters*, 14(11), 1134-1142.
- Crowther, T. W., Maynard, D. S., Crowther, T. R., Peccia, J., Smith, J. R., & Bradford, M. A. (2014). Untangling the fungal niche: the trait-based approach. *Frontiers in Microbiology*, 5, 579.
- Da Silva Alvarez, A., & Silva, R. J. F. (2012). Anatomia foliar de espécies de Eugenia L. (Myrtaceae) oriundas da restinga de Algodoal/Maiandeuá-Pará. *INSULA Revista de Botânica*, (41), 83-94.
- De Wit, R., & Bouvier, T. (2006). 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say?. *Environmental Microbiology*, 8(4), 755-758.
- Dighton, J. (2007). Nutrient Cycling by Saprotrophic Fungi in Terrestrial Habitats. *Environmental and Microbial Relationships*, 4, 287.
- Dumbrell, A. J., Nelson, M., Helgason, T., Dytham, C., & Fitter, A. H. (2010a). Idiosyncrasy and overdominance in the structure of natural communities of arbuscular mycorrhizal fungi: is there a role for stochastic processes?. *Journal of Ecology*, 98(2), 419-428.
- Dumbrell, A. J., Nelson, M., Helgason, T., Dytham, C., & Fitter, A. H. (2010b). Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal*, 4(3), 337-345.
- Espinosa-García, F. J., & Langenheim, J. H. (1990). The Endophytic Fungal Community in Leaves of a Coastal Redwood Population-Diversity and Spatial Patterns. *New Phytologist*, 89-97.
- Farr, D.F., & Rossman, A.Y. (2015). *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*, versión del 2 de marzo de 2015. En: ARS, USDA. Disponible desde: <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES> [Acceso el 2 de marzo de 2015].
- Feinstein, L. M., & Blackwood, C. B. (2013). The spatial scaling of saprotrophic fungal beta diversity in decomposing leaves. *Molecular Ecology*, 22(4), 1171-1184.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Frankland, J. C. (1992). Mechanisms in fungal succession. En: Carroll, G.C., & Wicklow, D.T. (Eds.). *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem*. Segunda edición. Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 383-401.
- Frankland, J. C., Dighton, J., & Boddy, L. (1990). Methods for studying fungi in soil and forest litter. En: Grigorova, R., & Norris, J.R. (Eds.). *Methods in microbiology*. Academic Press, Londres, 22(2), 343-404.
- Fryar, S. C. (2002). Fungal succession or sequence of fruit bodies. *Fungal Diversity*, 10, 5-10.
- Garrett, S. D. (1951). Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships. *New Phytologist*, 50(2), 149-166.
- Gause, G. F. (1934). *The struggle for existence*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

- Gessner, M. O., Swan, C. M., Dang, C. K., McKie, B. G., Bardgett, R. D., Wall, D. H., & Hättenschwiler, S. (2010). Diversity meets decomposition. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 372-380.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 1.
- Guo, L. D., Huang, G. R., & Wang, Y. (2008). Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 997-1003.
- Gutschick, V. P. (1999). Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist*, 143(1), 3-18.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*, 4, 1-9.
- Hättenschwiler, S., Tiunov, A. V., & Scheu, S. (2005). Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 191-218.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641-655.
- Hawksworth, D. L. (1997). Fungi and international biodiversity initiatives. *Biodiversity & Conservation*, 6(5), 661-668.
- Hawksworth, D. L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus: the Global Mycological Journal*, 2(2), 155.
- Hawksworth, D. L., & Mueller, G. M. (2005). Fungal communities: their diversity and distribution. En: Dighton, J., White, J.F., & Oudemans, P. (Eds.). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. Tercera edición. CRC Press, 27-37.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Reeb, V. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hill, M. O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54(2), 427-432.
- Hoffman, M. T., & Arnold, A. E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*, 112(3), 331-344.
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus: The Global Mycological Journal*, 2(1), 87.
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2013). iNEXT online: interpolation and extrapolation (Software, version 1.0, y Guía de Usuario). Disponible en: <http://chao.stat.nthu.edu.tw/blog/software-download/>

- Hubbell, S. P. (2001). *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press.
- Hudson, H. J. (1968). The ecology of fungi on plant remains above the soil. *New Phytologist*, 67(4), 837-874.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannan, B. J. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4399-4406.
- Hutchinson, G.E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp* 22:415–427.
- Hyde, K. D. (1997). Can we rapidly measure fungal diversity?. *Mycologist*, 11(4), 176-178.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163-173.
- Hyde, K. D., Bussaban, B., Paulus, B., Crous, P. W., Lee, S., Mckenzie, E. H., ... & Lumyong, S. (2007). Diversity of saprobic microfungi. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 7-35.
- Hyde, K.D. & Alias, S.A. (2000). Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing *Nypa fruticans*. *Biodiversity and Conservation*, 9(3), 393-402.
- Jennings, D. H., & Lysek, G. (1996). *Fungal biology: understanding the fungal lifestyle*. Bios Scientific Publishers Ltd.
- Jensen, V. (1974). Decomposition of Angiosperm tree leaf litter. En: Dickinson, C.H., & Pugh, G.J. (Eds.). *Biology of plant litter decomposition*. Academic Press, 69-104.
- Jewett, E. B., Hines, A. H., & Ruiz, G. M. (2005). Epifaunal disturbance by periodic low levels of dissolved oxygen: native vs. invasive species. *Mar Ecol Prog Ser*, 304, 31-44.
- 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.
- Jost, L. (2006). Entropy and diversity. *Oikos*, 113(2), 363-375.
- Kinkel, L. L., Andrews, J. H., Berbee, F. M., & Nordheim, E. V. (1987). Leaves as islands for microbes. *Oecologia*, 71(3), 405-408.
- Kirk, P.M. (1981). New or interesting microfungi III. A preliminary account of microfungi colonizing *Laurus nobilis* leaf litter. *Transactions of the British Mycological Society* 77, 457–473.
- Kirk, P.M. (1982). New or interesting microfungi V. Microfungi colonizing *Laurus nobilis* leaf litter. *Transactions of the British Mycological Society* 78, 293–303.
- Kirk, P.M. (1984). New or interesting microfungi XIII. Ascomycetes on *Laurus nobilis* leaf litter. *Mycotaxon* 19, 307–322.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 169-188.

- Kirk, P.M, & Cooper, J. (2010). *Index fungorum*, versión del 2 de marzo de 2015. En: *CABI Bioscience database*. Wallingford: CABI. Disponible desde: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> [Acceso el 2 de marzo de 2015].
- Kjoller, A., & Struwe, S. (1992). Functional groups of microfungi in decomposition. En: Carroll, G.C., & Wicklow, D.T. (Eds.). *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem*. Segunda edición. Marcel Dekker, Inc, 619-630.
- Krug, J. C. (2004). Moist chambers for the development of fungi. En: Mueller, G.M., Bills, G.F., & Foster, M.S. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, 589-593.
- Kumaresan, V., & Suryanarayanan, T. S. (2002). Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, 9, 81-91.
- Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Londres, 282-287.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661, 23-67.
- Legrand, D. (1968). *Las mirtáceas del Uruguay, III* (No. 7). Museo Nacional de Historia Natural.
- Leinster, T., & Cobbold, C. A. (2012). Measuring diversity: the importance of species similarity. *Ecology*, 93(3), 477-489.
- Li, D. W. (2013). Microscopic Methods for Analytical Studies of Fungi. En: Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Ayyachamy, M., Turner, K.M., & O'Donovan, A. (Eds.). *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. Springer, Nueva York, 113-131.
- Lodge, D. J. (1997). Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. *Biodiversity & Conservation*, 6(5), 681-688.
- Lonsdale, W. M. (1988). Predicting the amount of litterfall in forests of the world. *Annals of Botany*, 61(3), 319-324.
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing.
- Magurran, A. E. (2007). Species abundance distributions over time. *Ecology Letters*, 10(5), 347-354.
- Magurran, A. E., & Henderson, P. A. (2003). Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*, 422(6933), 714-716.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., ... & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102-112.
- McCune, B., Grace, J. B., & Urban, D. L. (2002). *Analysis of ecological communities*. MjM software design, Gleneden Beach, Oregon.
- Milius, S. (2014). The name of the fungus: Genetic advances spur mycologists to put their kingdom in order. *Science News*, 185(9), 22-26.



- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T-Manuales y Tesis SEA, Zaragoza, volumen 1, 1-84.
- Nakasone, K. K., Peterson, S. W., & Jong, S. C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. En: Mueller, G.M., Bills, G.F., & Foster, M.S. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, 37-47.
- Neubert, K., Mendgen, K., Brinkmann, H., & Wirsal, S. G. (2006). Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1118-1128.
- 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(8), 701-716.
- Palma, A. (2010). ¿ Nicho, teoría neutral, o una alternativa emergente?. *Ecología austral*, 20(1), 63-69.
- Paulus, B. C. (2004). *The diversity and distribution of microfungi in leaf litter of an Australian wet tropics rainforest*. Tesis de Doctorado, James Cook University.
- Paulus, B. C., Kanowski, J., Gadek, P. A., & Hyde, K. D. (2006). Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycological Research*, 110(12), 1441-1454.
- Peay, K. G., Garbelotto, M., & Bruns, T. D. (2010). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology*, 91(12), 3631-3640.
- Persson, T., Baath, E., Clarholm, M., Lundkvist, H., Söderström, B. E., & Söhlenius, B. (1980). Trophic structure, biomass dynamics and carbon metabolism of soil organisms in a Scots pine forest. *Ecological Bulletins*, 419-459.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. En: Andrews, J.H., & Hirano, S.S. (Eds.). *Microbial ecology of leaves*. Springer, Nueva York, 179-197.
- Pinruan, U., Hyde, K. D., Lumyong, S., McKenzie, E. H. C., & Jones, E. G. (2007). Occurrence of fungi on tissues of the peat swamp palm *Licuala longicalycata*. *Fungal Diversity*, 25(1), 157-173.
- Polishook, J. D., Bills, G. F., & Lodge, D. J. (1996). Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(3-4), 284-294.
- Ponge, J.F. (2005). Fungal communities: relation to resource succession. En: Dighton, J., White, J.F., & Oudemans, P. (Eds.). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. Tercera edición. CRC Press, 169-180.
- Poovaliah, B. W. (1974). Formation of callose and lignin during leaf abscission. *American Journal of Botany*, 829-834.
- Porta, C. J., López-Acevedo, M., & Roquero de Laburu, C. (1994). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

- Promptutha, I., Hyde, K. D., McKenzie, E. H., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2010). Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?. *Fungal Diversity*, 41(1), 89-99.
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., & Jeewon, R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53(4), 579-590.
- Promptutha, I., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E. C., & Hyde, K. D. (2002). Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* in Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. *Fungal Diversity*, 10, 89-100.
- Prosser, J. I., Bohannan, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., ... & Young, J. P. W. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 384-392.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142-160.
- Rees, G. N., Baldwin, D. S., Watson, G. O., Perryman, S., & Nielsen, D. L. (2005). Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(4), 339-347.
- Rosindell, J., Hubbell, S. P., & Etienne, R. S. (2011). The unified neutral theory of biodiversity and biogeography at age ten. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(7), 340-348.
- Sadaka, N., & Ponge, J. F. (2003). Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rotundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco). *Biology and Fertility of Soils*, 39(1), 30-36.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., ... & Wall, D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459), 1770-1774.
- Schechter, S. P., & Bruns, T. D. (2012). Edaphic sorting drives arbuscular mycorrhizal fungal community assembly in a serpentine/non-serpentine mosaic landscape. *Ecosphere*, 3(5), art42.
- Schneider, T., Keiblinger, K. M., Schmid, E., Sterflinger-Gleixner, K., Ellersdorfer, G., Roschitzki, B., ... & Riedel, K. (2012). Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *The ISME Journal*, 6(9), 1749-1762.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Griffith, G. W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Schulz, B., Guske, S., Dammann, U., & Boyle, C. (1998). Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis*, 25(1), 213-227.
- Shanthi, S., & Vittal, B. P. R. (2010). Fungi associated with decomposing leaf litter of cashew (*Anacardium occidentale*). *Mycology*, 1(2), 121-129.

- Shaw, P. J. A. (1992). Fungi, fungivores, and fungal food webs. En: Carroll, G.C., & Wicklow, D.T. (Eds.). *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem*. Segunda edición. Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 295-310.
- Soutullo, A. (2006). Assessing the completeness of biodiversity inventories: an example from Bañados del Este Biosphere Reserve, Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época)*, 15, 1-7.
- Staley, J. T. (1997). Biodiversity: are microbial species threatened?: Commentary. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 340-345.
- Stone, J.K., Polishook, J.D., & White, J.F.(2004). Endophytic fungi. En: Mueller, G.M., Bills, G.F., & Foster, M.S. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, 241-270.
- Sun, X., Ding, Q., Hyde, K. D., & Guo, L. D. (2012). Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology*, 5(5), 624-632.
- Suryanarayanan, T. S., & Thennarasan, S. (2004). Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity*, 15, 197-204.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Taylor, J. W. (2011). One fungus= one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus: The Global Mycological Journal*, 2(2), 113.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Thormann, M. N., Currah, R. S., & Bayley, S. E. (2003). Succession of microfungual assemblages in decomposing peatland plants. *Plant and Soil*, 250(2), 323-333.
- Tiscornia, S. (2012). *Comunidades de hongos endofíticos de Myrtaceae neotropicales: evaluación de la producción de enzimas y metabolitos bioactivos*. Tesis de Doctorado, Universidad de la República.
- Tiscornia, S., & Bettucci, L. (2014). Endophytic fungal community of *Myrcianthes cisplatensis* and *Myrrhinium atropurpureum* var. *octandrum* (Myrtaceae) in Uruguay. *Sydowia*, 66(1), 1-17.
- Tiscornia, S., Ruiz, R., & Bettucci, L. (2012). Fungal endophytes from vegetative and reproductive tissues of *Eugenia uruguayensis* in Uruguay. *Sydowia*, 64(2), 313-328.
- Tuomisto, H. (2010). A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist. *Oecologia*, 164(4), 853-860.
- Unterseher, M., Peršoh, D., & Schnittler, M. (2013). Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. *Fungal Diversity*, 60(1), 43-54.

- Unterseher, M., Schnittler, M., Dormann, C., & Sickert, A. (2008). Application of species richness estimators for the assessment of fungal diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 205-213.
- Van der Wal, A., Geydan, T. D., Kuyper, T. W., & de Boer, W. (2013). A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(4), 477-494.
- Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., & Stielow, J. B. (2014). Novel genera and species of *Coniothyrium*-like fungi in Montagnulaceae (Ascomycota). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32, 25.
- Voříšková, J., & Baldrian, P. (2012). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *The ISME Journal*, 7(3), 477-486.
- Webber, J. F., & Gibbs, J. N. (1989). Insect dissemination of fungal pathogens of trees. En: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., & Webber, J.F. (Eds.). *Insect-fungus interactions*, Academic Press, San Diego, 161-175.
- Westerdijk, J. (1949). The concept „association” in mycology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 15(1), 187-189.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., & White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Londres, 315-322.
- Yanna, W. H., & Hyde, K. D. (2001a). Fungal communities on decaying palm fronds in Australia, Brunei, and Hong Kong. *Mycological Research*, 105(12), 1458-1471.
- Yanna, H. W., Hyde, K. D., & Goh, T. K. (2001b). Occurrence of fungi on tissues of *Livistona chinensis*. *Fungal Diversity*, 6, 167-180.
- Zhou, D., & Hyde, K. D. (2001). Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research*, 105(12), 1449-1457.

## ANEXO I

En este anexo se presenta la composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo.

<b>Agar Extracto de Malta al 2% (MEA)</b> (Bills & Foster, 2004)	
Extracto de malta	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Medio apropiado para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de gran variedad de hongos.

<b>Agar Extracto de Malta con Cloranfenicol</b> (MEA-CL) (Bills & Foster, 2004)	
Extracto de malta	20 g
Agar	20 g
Cloranfenicol	120 mg
Agua destilada	1000 ml

Medio apropiado para el aislamiento de hongos del suelo y de la hojarasca.

<b>Agar Hojas de Clavel (CLA)</b> (Atlas, 2010)	
Hojas de clavel	variable
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Cortar hojas en trozos de 5mm. Secarlas en horno a 40-55°C por dos horas. Esterilizarlas por irradiación gamma. Preparar el agar-agua y autoclavarlo. Ni bien se llenan las placas de Petri, se depositan algunos trozos en la superficie.

Medio utilizado para el estudio de algunos géneros como *Fusarium*.

<b>Agar Nutriente Sintético (SNA)</b> (Bills & Foster, 2004)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KNO <sub>3</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> +7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCL	0,5 g
Glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1000 ml

Medio recomendado para observar la esporulación de algunos hongos mitospóricos como *Fusarium*.

<b>Agar Papa Dextrosa (PDA)</b> (Bills & Foster, 2004)	
Papa	200 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	c. s.p. 1000 ml

Trocear las papas. Hervir 20 minutos. Filtrar con gaza. Llevar a volumen con el agua destilada. Autoclavar.

Medio apropiado para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de gran variedad de hongos.

<b>Agar Papa Zanahoria (PCA)</b> (Bills & Foster, 2004)	
Papa pelada	40 g
Zanahoria pelada	40 g
Agar	20 g
Agua destilada	c. s.p. 1000 ml

Triturar la zanahoria y trocear las papas. Hervir 15 minutos. Filtrar la mezcla con gaza. Llevar a volumen con agua destilada. Autoclavar.

Medio muy apropiado para estimular la esporulación de los hongos.

## ANEXO II

En este anexo se presentan las matrices de presencia-ausencia obtenidas tanto para el método directo como indirecto.

**Tabla II.1. Matriz de presencia-ausencia para cada cámara húmeda de las categorías analizadas por el método directo**

Taxones	Cámaras húmedas de hojas integra										Cámaras húmedas de hojas lesionadas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Alternaria alternata</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Beltrania rhombica</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Beltraniella portoricensis</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Calonectria insularis</i>	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ceratocystis sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Cercophora samala</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium funicula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Chloridium botryodeum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Clonostachys rosea</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>Coleophoma empetri</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Colletotrichum dematium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coniella castaneicola</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coniothyrium sp.</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynascus sepedonium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>Cytospora chrysosperma</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Dactylaria eucalypti</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
<i>Diaporthe sp.</i>	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Dictyochoeta assamica</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
<i>Dinemasporium sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Discosia strobilina</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mariannaea elegans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycoleptodiscus sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
<i>Periconia byssoides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
<i>Pseudoseptoria donacis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Ramichloridium australiense</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sarocladium kiliense</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Sordaria fimicola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Sporidesmium dioscoreae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Sympodiella sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Wiesneriomyces laurinus</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
<i>Xylaria sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

**Tabla II.2. Matriz de presencia-ausencia para cada unidad muestral de las categorías analizadas por el método indirecto.**

Taxones	Código	Unidades muestrales de PECÍOLO																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Alternaria alternata</i>	ALA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	APU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bartalinia robillardoides</i>	BRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beltrania rhombica</i>	BRH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beltraniella portoricensis</i>	BPO	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beltraniella sp. 1</i>	BE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beltraniella sp. 2</i>	BE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Calonectria insularis</i>	CIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CCL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coleophoma crateriformis</i>	CCR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coleophoma empetri</i>	CEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Colletotrichum dematium</i>	CDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coniella castaneicola</i>	CCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindrocladiella elegans</i>	CEL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dendrothyrium sp.</i>	DEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	DFO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe infecunda</i>	DIN	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe oxe</i>	DOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Diaporthe sp. 1</i>	DI1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe sp. 2</i>	DI2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	DTE	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	ENI	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium dlamini</i>	FDL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium incarnatum</i>	FIN	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium sambucinum</i>	FSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium tricinctum</i>	FTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptostroma sp.</i>	LEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	MAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paraconiothyrium archidendri</i>	PAR	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Paraconiothyrium fungicola</i>	PFU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	PGU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phialemonium sp.</i>	PHI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phoma sp.</i>	PHO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phyllosticta eucalyptorum</i>	PEU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Seimatosporium dilophosporum</i>	SDI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	SSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sterphyllum botryosum</i>	SBO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Trichoderma reesei</i>	TRE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xylaria sp.</i>	XYL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zetiaspizna acaciae</i>	ZAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Peronosporaceae	PER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phaciaceae	PHA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phaeosphaeriaceae	PHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sordariomycete	SOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril hialino 1	MH1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril hialino 2	MH2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril oscuro 1	MO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril oscuro 2	MO2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril oscuro 3	MO3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril oscuro 4	MO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril oscuro 5	MO5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0





Tabla II.2. (Continuación)

Código	Unidades muestrales de PECÍOLO																															
	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83		
ALA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0		
APU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
BRH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
BPO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
BE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
BE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CCL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
CCR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
CDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CCA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CEL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DFO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DOX	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DI1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DI2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DTE	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0			
ENI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0			
FDL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
FIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1			
FOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
FSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
FTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
LEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PAR	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PFU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PGU	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PHI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PHO	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PEU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
SDI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
SSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0			
SBO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
TRE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
XYL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
ZAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PHA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
SOR	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MH2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MO2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MO3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MO5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			

Tabla II.2. (Continuación)

Unidades muestrales de LÁMINA ÍNTEGRA																																							
Código	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115							
ALA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
APU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
BRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
BRH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
BPO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
BE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
BE2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
CIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
CCL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
CCR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0						
CEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0						
CDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
CCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
CEL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
DEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DFO	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
DIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DI1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DI2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
DTE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
ENI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
FDL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
FIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
FTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LFP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PFU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
PGU	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1		
PHI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PHO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PEU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SDI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SBO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TRE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
XYL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ZAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
PHA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MH2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
MO2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MO3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0





Tabla II.2. (Continuación)

Código	Unidades muestrales de LÁMINA LESIONADA																																				
	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183		
ALA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
APU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BR0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BRH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BPO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BE2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
CIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
CCL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
CCR	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
CEM	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
CDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
CCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1		
CEL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
DEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DF0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
DIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DI1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DI2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DTE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ENI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FDL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LEP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
PFU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PGU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PHI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PHO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SDI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SBO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XYL	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
PHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MH2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MO5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## ANEXO III

En este anexo se presentan las especies de hongos que fueron identificadas, incluyendo material fotográfico original y alguna información sobre su distribución, su preferencia de sustrato, su potencial fitopatogénico y su clasificación. Esta información se obtuvo de la base de datos de hongos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Farr & Rossman, 2015) y de la base de datos del Index Fungorum (Kirk & Cooper, 2010).

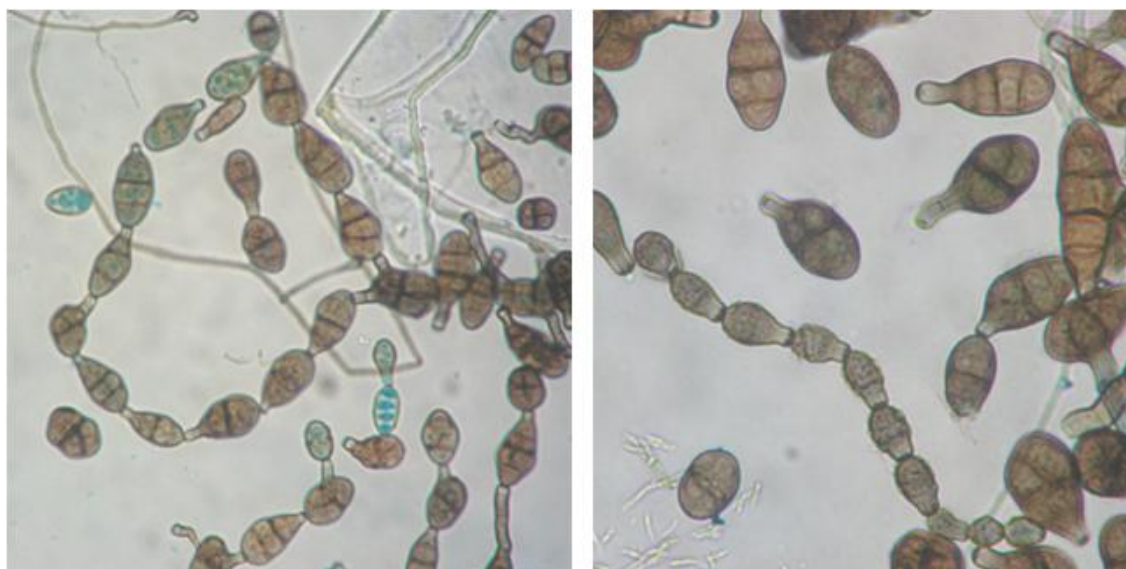
### ***Alternaria alternata*** (Fr.) Keissl.

Saprótrofo cosmopolita, comúnmente encontrado en todo tipo de material vegetal muerto. Puede causar manchas foliares y podredumbres. Se encuentra en hospederos de múltiples géneros en múltiples familias. Ver figuras III.1 y III.2.

Clasificación: Pleosporaceae, Pleosporales,  
Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina,  
Ascomycota



**Figura III.1. Cultivo de *Alternaria alternata* en MEA.**



**Figura III.2. Cadenas de dictioconidios de *Alternaria alternata*.**

***Aureobasidium pullulans*** (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud

Saproótrofo cosmopolita, encontrado en gran variedad de sustratos. Aparece comúnmente como epífito foliar y es un contaminante común. *Aureobasidium* es el anamorfo de *Discophaerina*. Ver figura III.3.

Clasificación: Saccotheciaceae, Dothideales,  
Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina,  
Ascomycota



**Figura III.3. Cultivo de *Aureobasidium pullulans* en MEA.**

***Bartalinia robillardoides*** Tassi

Cosmopolita, saprótrofo encontrado en el mantillo foliar de varios tipos de planta. Ver figura III.4.

Clasificación: Amphisphaeriaceae, Xylariales,  
Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina,  
Ascomycota

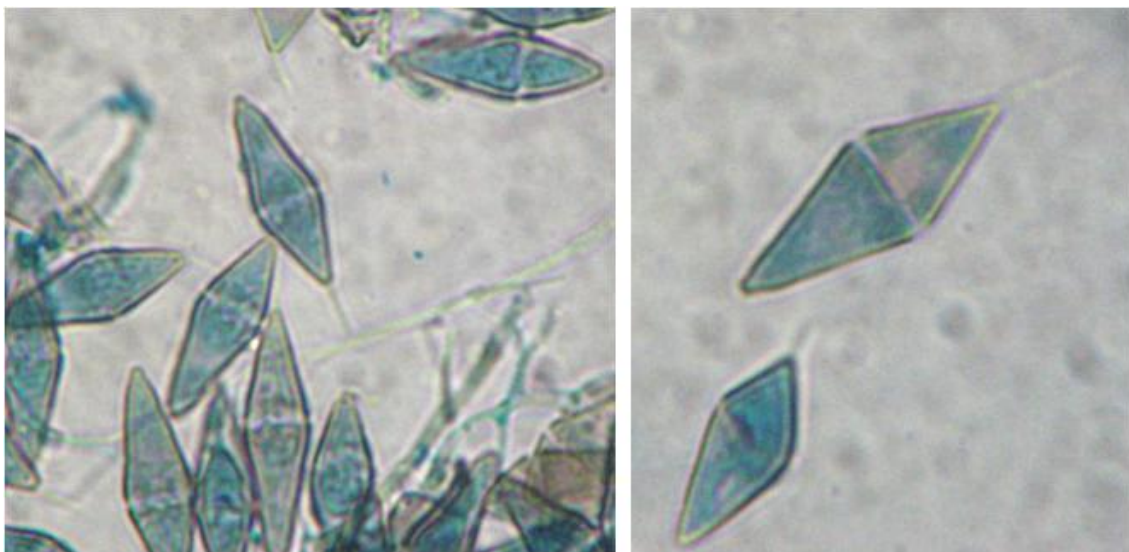


**Figura III.4. Cultivo de *Bartalinia robillardoides* en MEA.**

***Beltrania rhombica*** Penz.

Saprótrofo de distribución pantropical, encontrado en varios materiales de distintas especies hospederas. Ver figura III.5.

Clasificación: Incertae sedis, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.5. Conidios de *Beltrania rhombica*.**

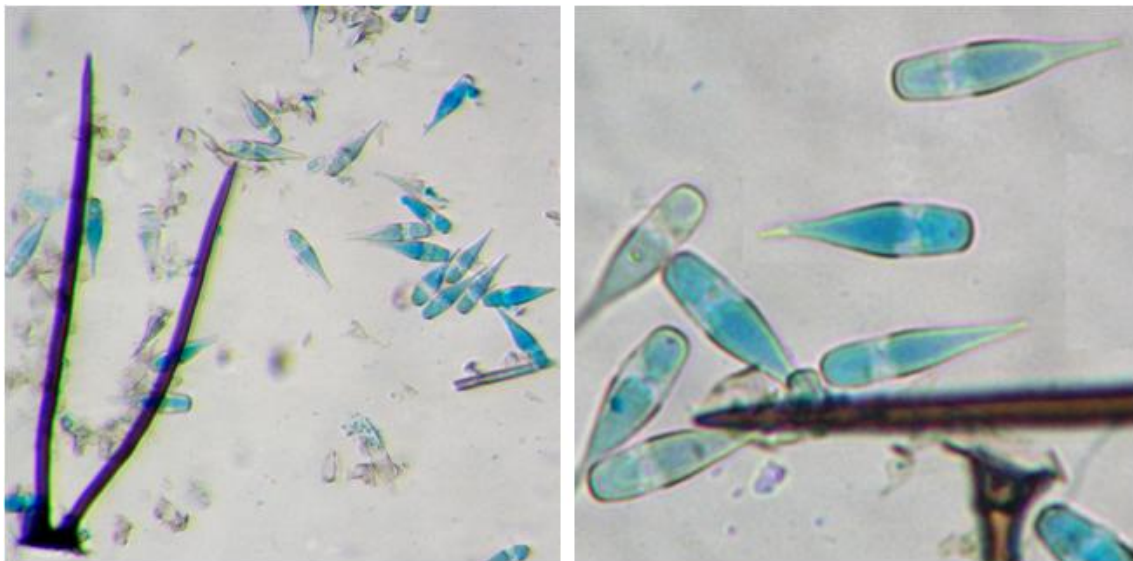
***Beltraniella portoricensis*** (F. Stevens) Piroz. & S.D. Patil

También conocida por su antiguo nombre *Ellisiopsis galesiae*. Es una especie ampliamente distribuida, comúnmente encontrada en el mantillo foliar de diversas plantas hospederas. Su teleomorfo es *Pseudomassaria carolinensis*. Ver figuras III.6 y III.7.

Clasificación: Hyponectriaceae, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota.



**Figura III.6.** Cultivo de *Beltraniella portoricensis* en MEA.



**Figura III.7.** Conidios y setas de *Beltraniella portoricensis*.

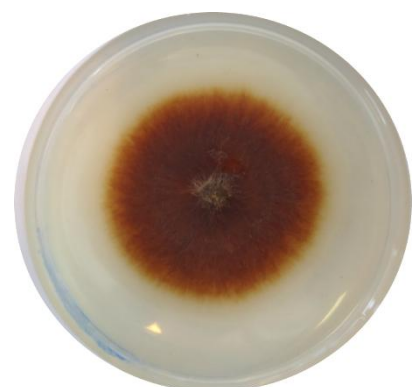
***Blastomyces dermatitidis*** Gilchrist & W.R. Stokes

Patógeno oportunista de humanos, se encuentra comúnmente en hojarascas.

Clasificación: Incertae sedis, Pezizomycotina, Ascomycota

***Calonectria insularis*** C.L. Schoch & Crous

De distribución tropical y subtropical, asociado a varias familias hospederas, puede causar mancha foliar y podredumbre de raíces. El anamorfo de esta especie era conocido como *Cylindrocladium insularea*. Ver figura III.8 y III.9.



**Figura III.8.** Cultivo de *Calonectria insularis* en MEA.



Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

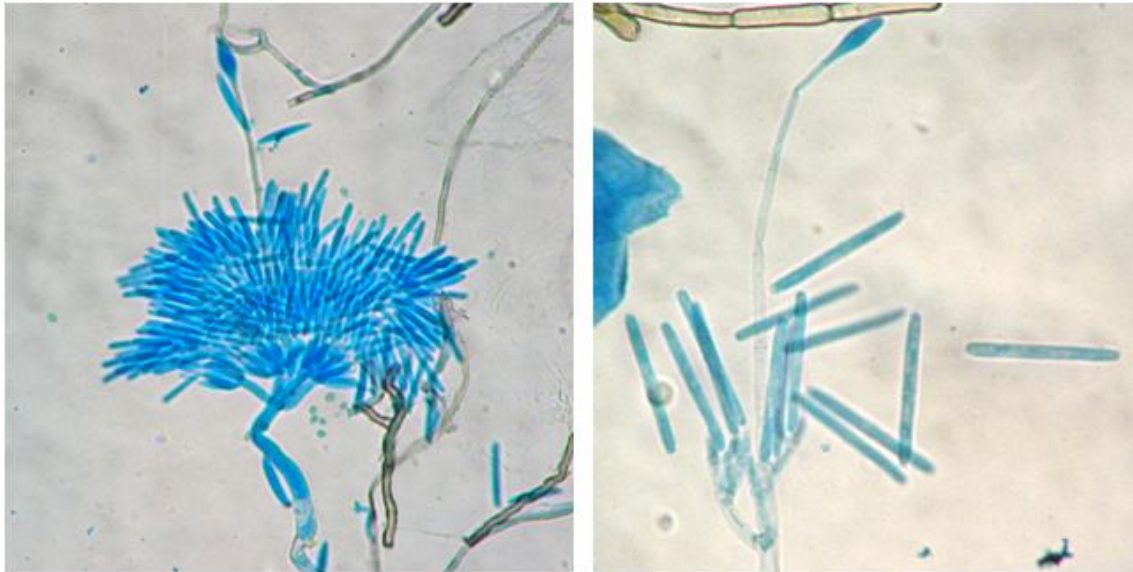


Figura III.9. Estructuras de reproducción asexual de *Calonectria insularis*. Se observa conidióforo, macroconidios ( $\approx 37 \mu\text{m}$ ) y vesícula ( $\approx 18 \mu\text{m}$ ).

***Ceratocystis* sp.** Ellis & Halst.

Ver figura III.10 y III.11.

Clasificación: Incertae sedis, Microascales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

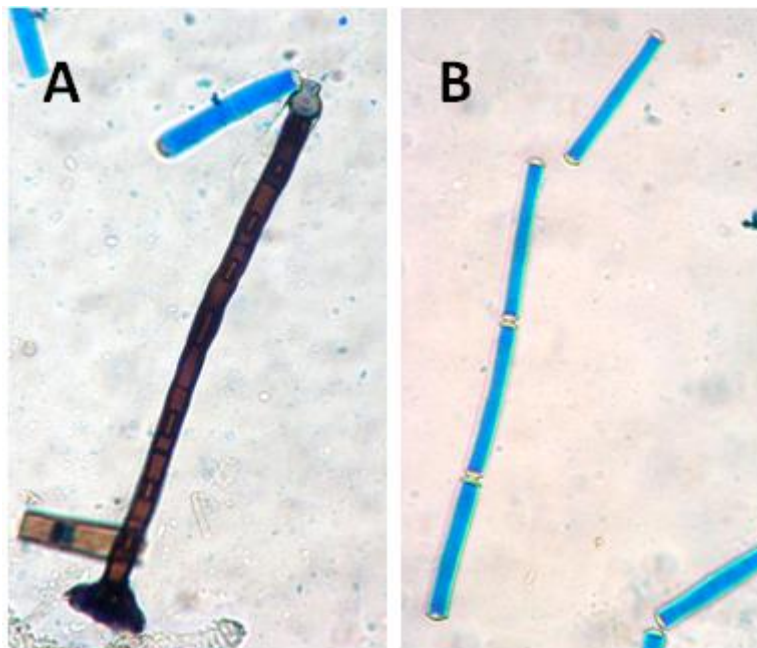
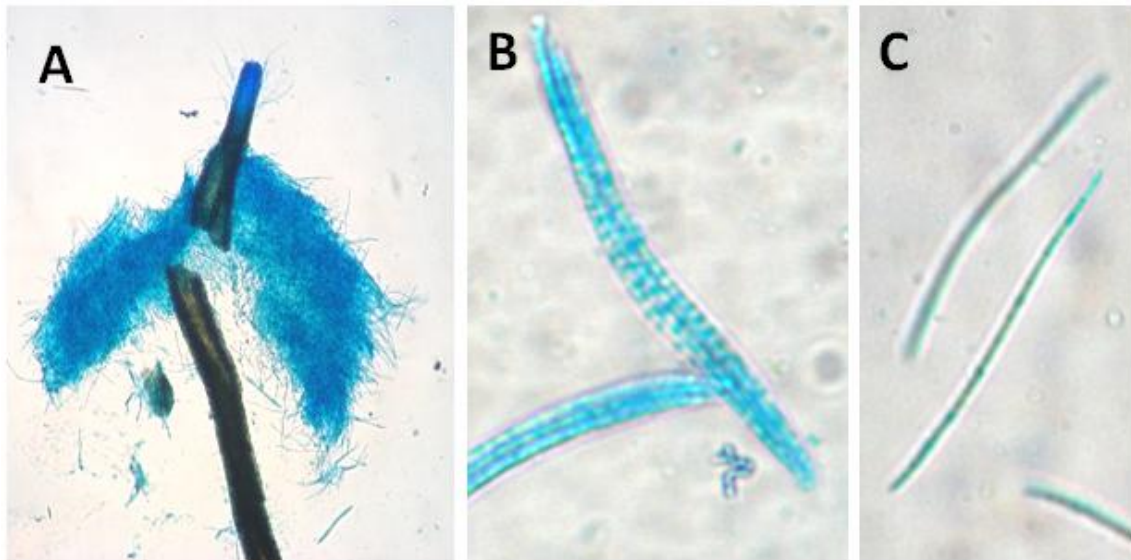


Figura III.10. Estructuras asexuales de *Ceratocystis* sp.. **A)** conidióforo macronematoso con *collarete*; **B)** cadena de conidios ( $\approx 45 \times 7 \mu\text{m}$ ).



**Figura III.11. Estructuras sexuales de *Ceratocystis* sp.. A)** cuello roto del peritecio y gran cantidad de ascosporas; **B)** ascos ( $\approx 75 \times 6 \mu\text{m}$ ); **C)** ascosporas filiformes ( $\approx 70 \mu\text{m}$ ).

***Cercophora samala*** Udagawa & T. Muroi

Hongo saprótrofo encontrado en heces de vaca y en hojarasca.

Clasificación: Lasiosphaeriaceae, Sordariales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Chaetomium funicola*** Cooke

Hongo cosmopolita, encontrado en mantillo, puede producir podredumbre blanda de la madera.

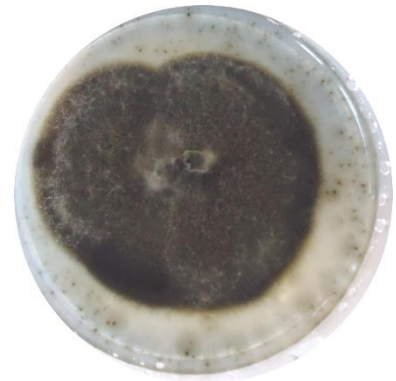
Clasificación: Chaetomiaceae, Sordariales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Chloridium botryoideum*** (Corda) S. Hughes

Clasificación: Chaetosphaeriaceae, Chaetosphaeriales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Cladosporium cladosporioides*** (Fresen.) G.A. de Vries

Especie cosmopolita, comúnmente encontrada en restos vegetales muertos, aunque también en hojas, semillas e inflorescencias. Puede causar mancha foliar y tizón foliar. Es un patógeno secundario de una gran variedad de plantas. Se asocia a múltiples géneros de múltiples familias. *Cladosporium* es el anamorfo de *Davidiella*. Ver figura III.12.



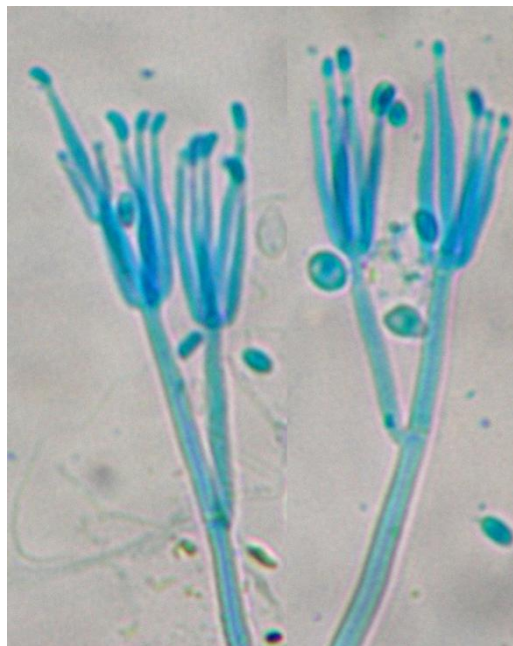
**Figura III.12. Cultivo de *Cladosporium cladosporioides* en MEA.**

Clasificación: Cladosporiaceae, Capnodiales, Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

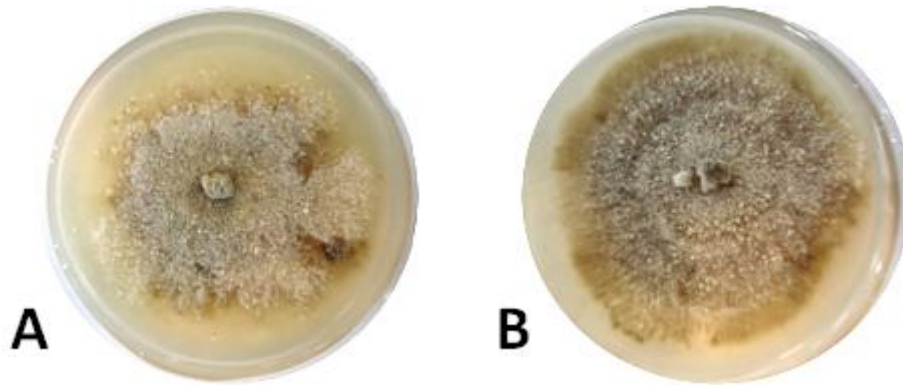
***Clonostachys rosea*** (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams

Hongo cosmopolita, encontrado en varias partes de las plantas, tanto vivas como muertas de diversas especies hospederas. Puede causar acronecrosis y podredumbre de raíces, vainas y coronas, puede encontrarse también como endófito o saprótrofo. También conocido por su antiguo nombre *Gliocladium roseum*. Ver figura III.13.

Clasificación: Bionectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.13. Conidióforos de *Clonostachys rosea*. Se pueden observar las fiálides portando todavía los conidios reniformes característicos.**



**Figura III.14. Cultivos de las especies de *Coleophoma*. A)** cultivo de *Coleophoma crateriformis* en MEA; **B)** cultivo de *Coleophoma empetri* en MEA.

***Coleophoma crateriformis*** (Durieu & Mont.) Höhn

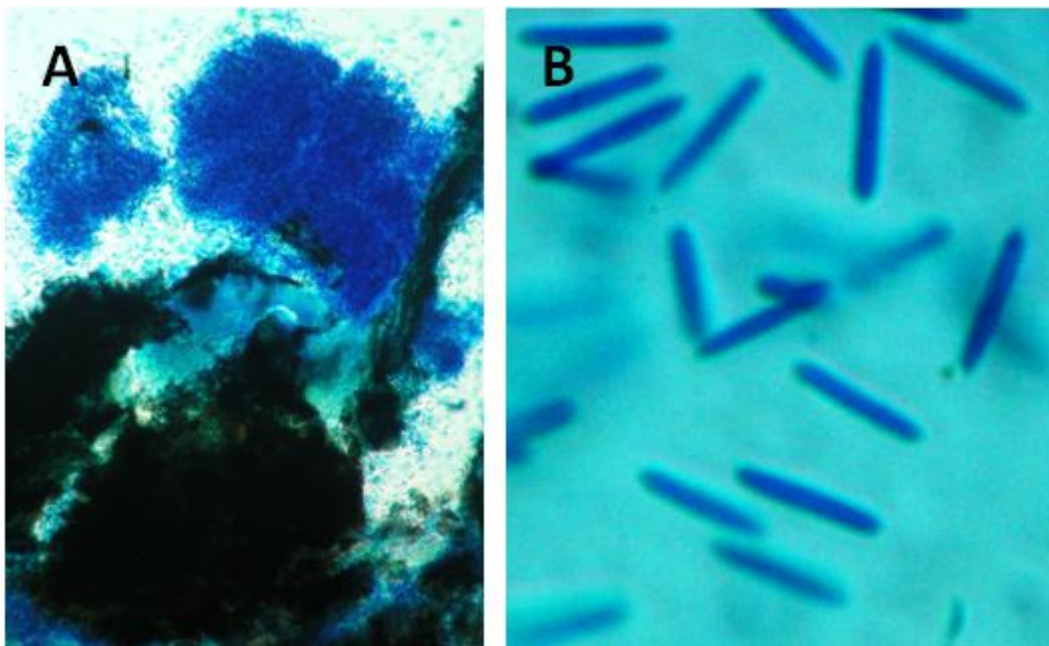
Ver figura III.14.A.

Clasificación: Incertae sedis, Pezizomycotina, Ascomycota

***Coleophoma empetri*** (Rostr.) Petr.

Hongo cosmopolita, se encuentra en hojas y frutos vivos y muertos. Puede producir manchas y podredumbres. Se asocia a numerosas familias de plantas. Ver figura III.14.B y III.15

Clasificación: Incertae sedis, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.15. Estructuras de reproducción asexual de *Coleophoma empetri*. A)** picnidio roto por aplastamiento liberando gran cantidad de conidios; **B)** conidios de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ .



***Colletotrichum dematium*** (Pers.) Grove

Hongos cosmopolita, se asocia a frutos, hojas y tallos de múltiples hospederos vegetales. Puede causar antracnosis, mancha foliar y podredumbre de frutos, entre otras enfermedades. *Colletotrichum* es el anamorfo de *Glomerella*. Ver figuras III.16 y III.17.

Clasificación: Glomerellaceae, Incertae sedis, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

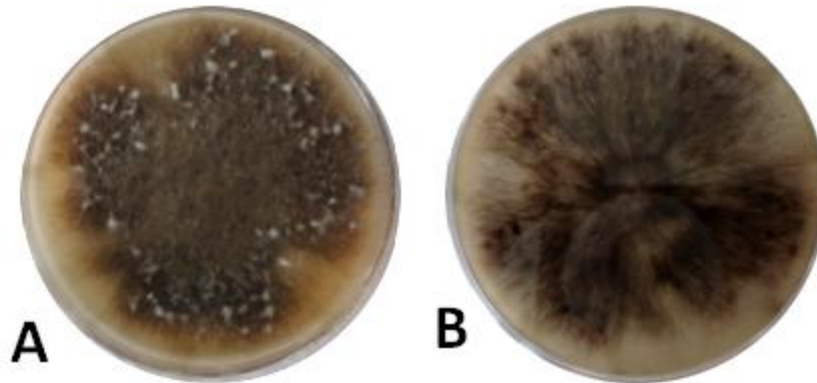


Figura III.16. Cultivo de *Coleophoma empetri* en MEA. A) anverso; B) reverso.

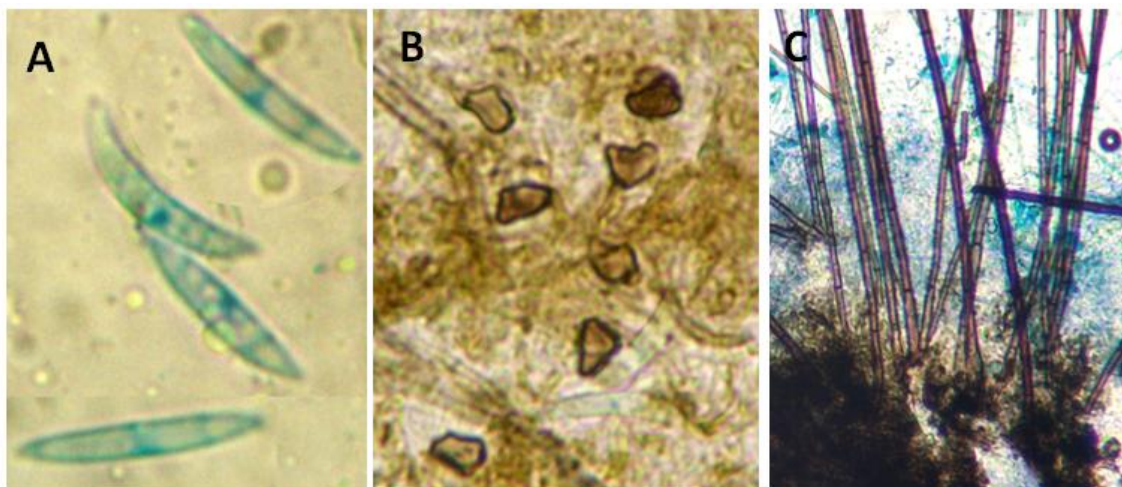


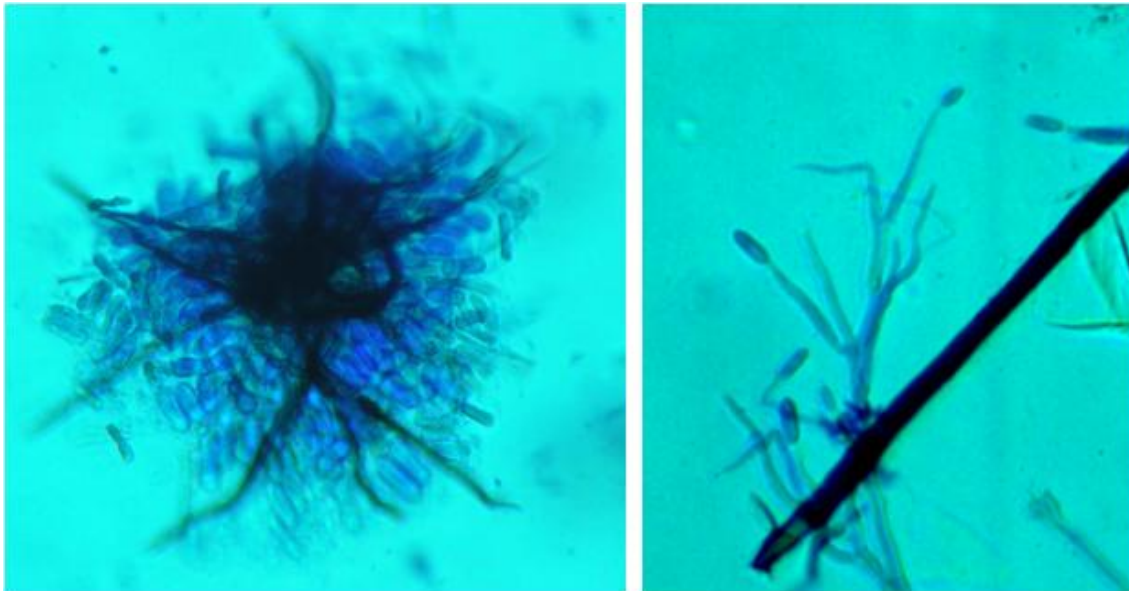
Figura III.17. Estructuras características de *Colletotrichum dematium*. A) conidios gutulados ( $\approx 19,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ ); B) apresorios; C) setas.

***Colletotrichum gloeosporioides*** (Penz.) Penz. & Sacc.

Hongo cosmopolita, aparece en hojas y pecíolos, frutos, ramas y tallos vivos. Asociado a múltiples familias hospederas, puede causar antracnosis de tallos y hojas, acronecrosis, podredumbre de raíces, mancha foliar, pudrición de la flor y podredumbre de frutos. Con

alrededor de 600 especies sinónimas, constituye un complejo de especies crípticas. El teleomorfo de *Colletotrichum* es *Glomerella*. Ver figura III.18.

Clasificación: Glomerellaceae, Incertae sedis, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

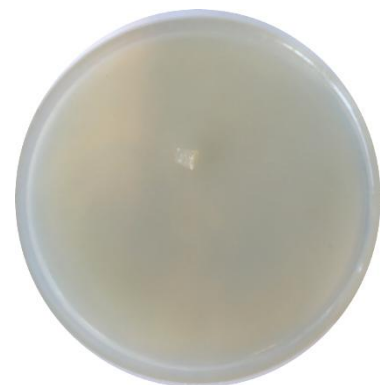


**Figura III.18. Estructuras de reproducción asexual de *Colletotrichum gloeosporioides*.** A la izquierda: esporogonio formado en las hojas. A la derecha: detalle de las filídes, los conidios y las setas.

***Coniella castaneicola*** (Ellis & Everh.) B. Sutton

Presente en regiones templadas y tropicales, en hojas muertas y senescentes de varios géneros vegetales. Puede causar mancha foliar. Ver figura III.19.

Clasificación: Schizoparmaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

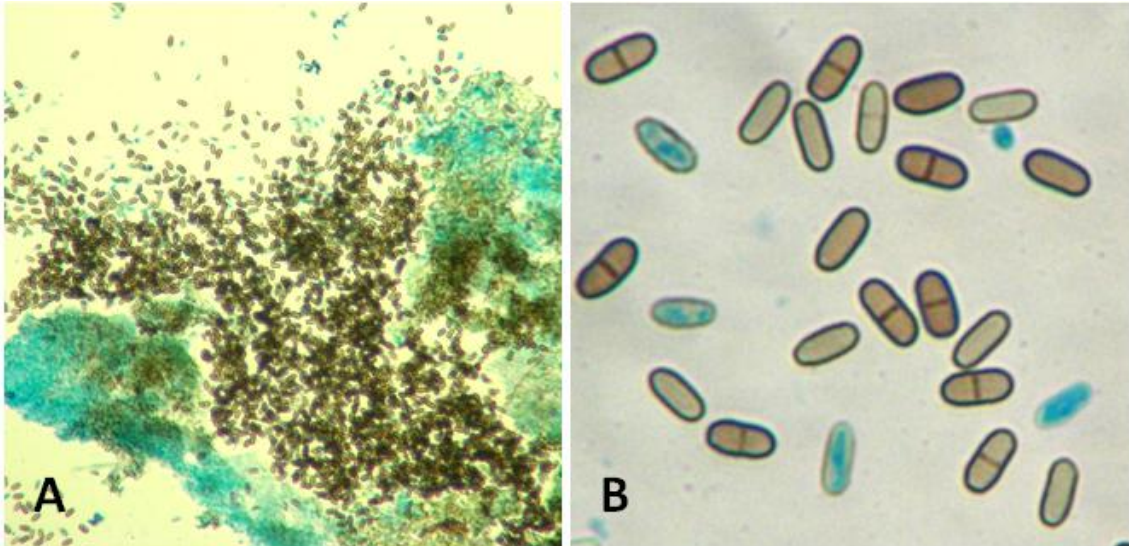


**Figura III.19. Cultivo de *Coniella castaneicola* en MEA.**

***Coniothyrium sp.*** Corda.

Ver figura III.20.

Clasificación: Coniothyriaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

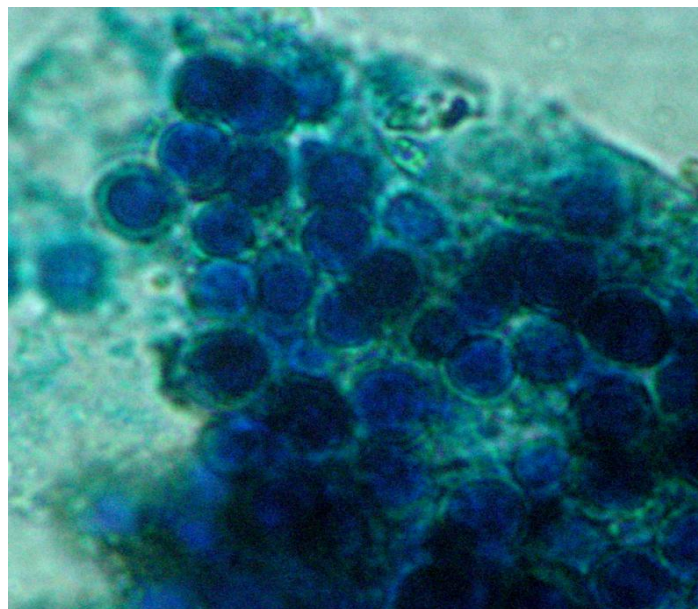


**Figura III.20. Estructuras de reproducción asexual de *Coniothyrium* sp.. A) picnidio roto por aplastamiento y masa de esporas; B) conidios ( $\approx 10 \times 4 \mu\text{m}$ ) con distinto grado de madurez y septación.**

***Corynascus sepedonium* (C.W. Emmons) Arx**

Hongo cosmopolita del suelo. El anamorfo es *Sepedonium*. Ver figura III.21.

Clasificación: Chaetomiaceae, Sordariales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.21. Conidios de *Corynascus sepedonium*. Esféricos y levemente equinulados.**



***Cylindrocladiella elegans*** Crous & M.J. Wingf.

Especie encontrada en Sudáfrica, Hong Kong y Australia., asociada a varios géneros hospederos, entre ellos algunas Myrtáceas. Especie fitopatógena, pudiendo causar podredumbre de raíces. *Cylindrocladiella* es el anamorfo de *Nectricladiella*. Ver figura III.22.



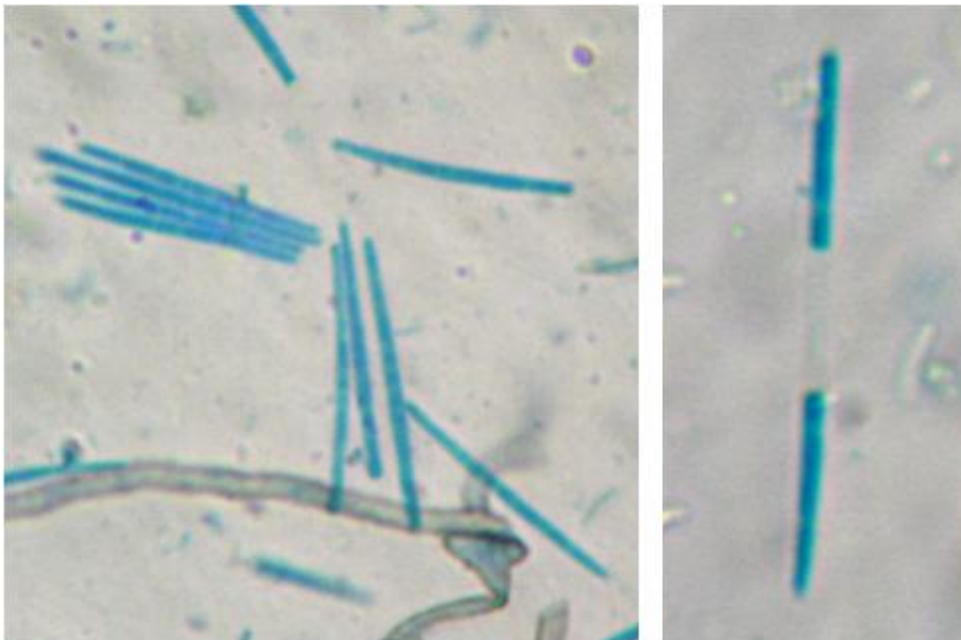
**Figura III.22.** Cultivo de *Cylindrocladiella elegans* en MEA.

Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales,  
Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina,  
Ascomycota

***Cytospora chrysosperma*** (Pers.) Fr.

Especie ampliamente distribuida, asociada a corteza y ramas, produce canchros y necrosis. Se encuentra mayormente en especies de Salicaceae, pero también en otras maderas duras.

Clasificación: Valsaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina,  
Ascomycota



**Figura III.23.** Conidios de *Dactylaria eucalypti*. A la izquierda: conidios ( $\approx 20 \mu\text{m}$ ) uni o biseptados. A la derecha: detalle de un conidio que revela su par de septos al haber perdido el contenido citoplasmático de la célula central.



***Dactylaria eucalypti*** Vittal & Dorai

Encontrada en el mantillo de *Eucalyptus tereticornis*. Ver figura III.23.

Clasificación: Incertae sedis, Helotiales, Leotiomycetidae, Leotiomyces, Pezizomycotina, Ascomycota

***Dendrothyrium* sp.** Verkley, Göker & Stielow

Ver figura III.24.

Clasificación: Montagnulaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.24. Cultivo de *Dendrothyrium* sp. en MEA.**

***Diaporthe foeniculacea*** Niessl

Encontrada en Australia, Europa y Sudáfrica, asociada a varios géneros vegetales. Puede causar tizón de vástagos, marchitez y ramas anilladas. El anamorfo del género *Diaporthe* es *Phomopsis*. Ver figura III.25.A.

Clasificación: Diaporthaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Diaporthe infecunda*** R.R. Gomes, C. Glienke & Crous

Este hongo fue encontrado solamente en Brasil, viviendo endofíticamente en láminas y pecíolos de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) y *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). El anamorfo del género *Diaporthe* es *Phomopsis*. Ver figura III.25.B.

Clasificación: Diaporthaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Diaporthe oxe*** R.R. Gomes, C. Glienke & Crous

Este hongo fue encontrado solamente en Brasil, viviendo endofíticamente en láminas y pecíolos de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) y *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). El anamorfo del género *Diaporthe* es *Phomopsis*. Ver figura III.25.C.

Clasificación: Diaporthaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

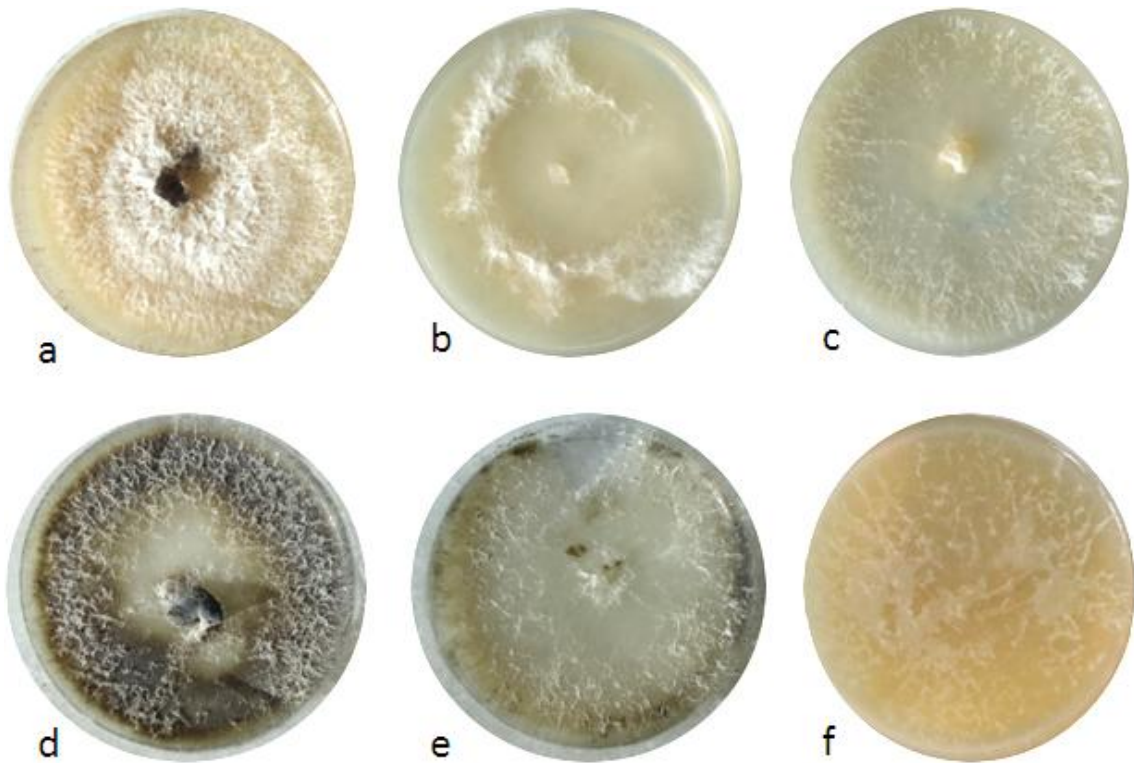


Figura III.25. Cultivos en PDA de las distintas especies de *Diaporthe* encontradas en este trabajo. A) *D. foeniculacea*, B) *D. infecunda*, C) *D. oxe*, D) *D. terebinthifolii*, E) *D. sp. 1*, F) *D. sp. 2*.

***Diaporthe terebinthifolii*** R.R. Gomes, C. Glienke & Crous

Este hongo fue encontrado solamente en Brasil, viviendo endofíticamente en tejidos de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). Ver figura III.25.D.

Clasificación: Diaporthaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Diaporthe sp. 1*** Nitschke

Ver figura III.25.E.

Clasificación: Diaporthaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Diaporthe sp. 2*** Nitschke

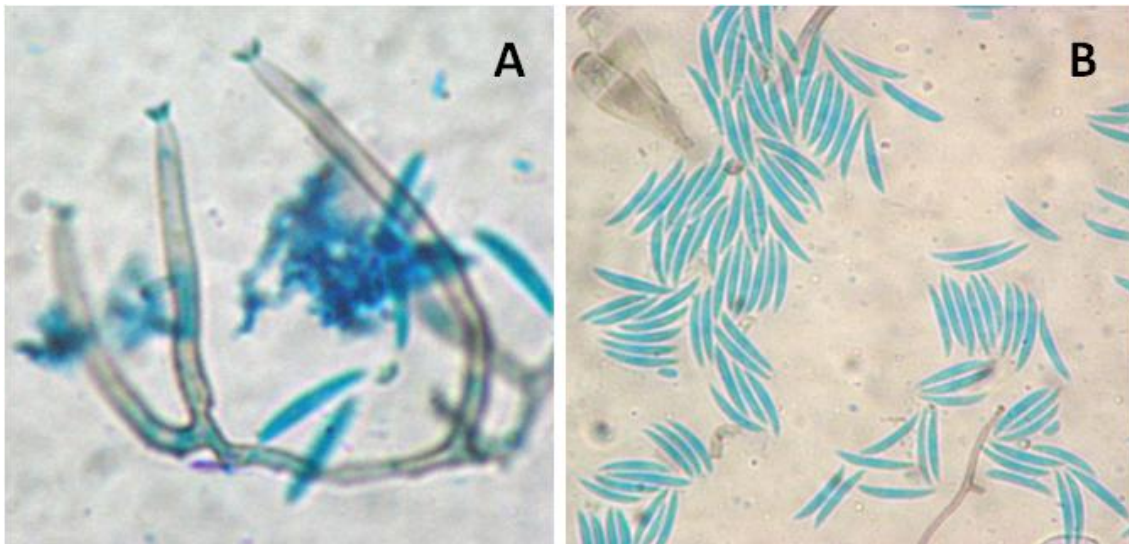
Ver figura III.25.F.

Clasificación: Diaporthaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Dictyochaeta assamica*** (Agnihotr.) Aramb., Cabello & Mengasc.

Hongo encontrado en mantillos vegetales. También conocido por su antiguo nombre *Codinaea assamica*. El género *Dictyochaeta* es el anamorfo de *Chaetosphaeria*. Ver figura III.26.

Clasificación: Chaetosphaeriaceae, Chaetosphaeriales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.26. Estructuras de reproducción asexual de *Dictyochaeta assamica*. A) conidióforos con *collarete*; B) conidios (aseptados y bisetulados).**

***Dinemasporium sp.*** Lév.

Clasificación: Incertae sedis, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Discosia strobilina*** Lib. ex Sacc

Ampliamente distribuida, fue encontrada en hojas vivas y muertas.

Clasificación: Amphisphaeriaceae, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Epicoccum nigrum*** Link

Especie cosmopolita, suele encontrarse como epífito o sobre hojas caídas. Ver figura III.27.

Clasificación: Pleosporaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.27.** Cultivo de *Epicoccum nigrum* en MEA.

***Fusarium dlaminii*** Marasas, P.E. Nelson & Toussoun

Especie encontrada en Sudáfrica y Argentina, en restos vegetales. *Fusarium* es el anamorfo de *Gibberella*. Ver figura III.28.

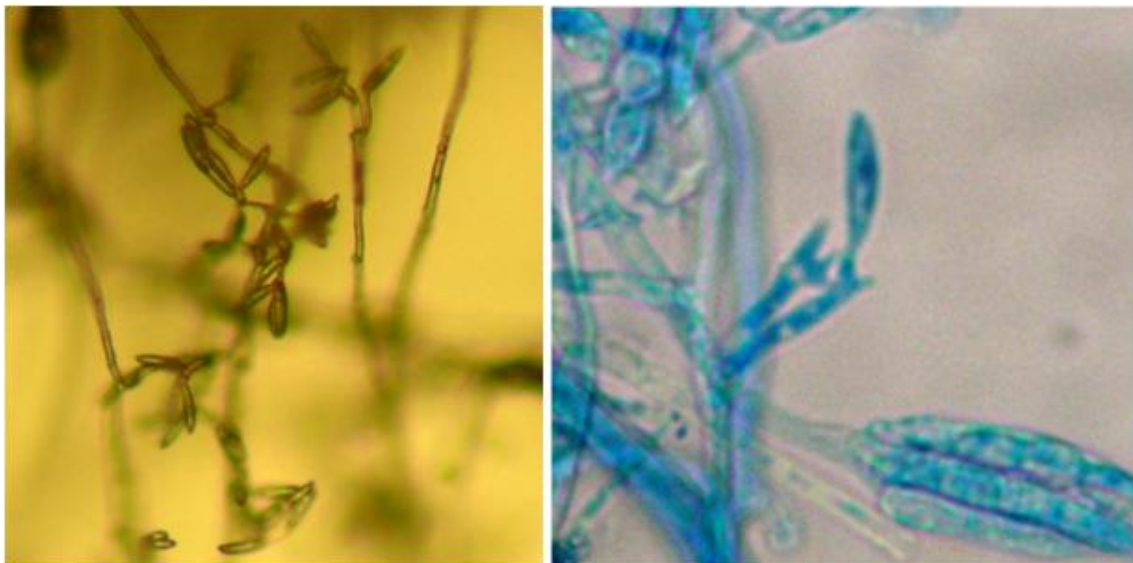
Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.28.** Cultivo de *Fusarium dlaminii* en MEA.

***Fusarium incarnatum*** (Desm.) Sacc.

Tiene por especies sinónimas a *Fusarium semitectum* y *Fusarium pallidoroseum*. Se encuentra en regiones templadas y tropicales, en hojas, raíces y semillas. Causa numerosas antracnosis, marchitamiento y podredumbre caulinar, y podredumbre de frutas. Se asocia a diversas plantas hospederas. Ver figuras III.29 y III.30.



**Figura III.29.** Microconidios en polifiálides de *Fusarium incarnatum*. A la izquierda por observación directa del cultivo al microscopio óptico.

Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

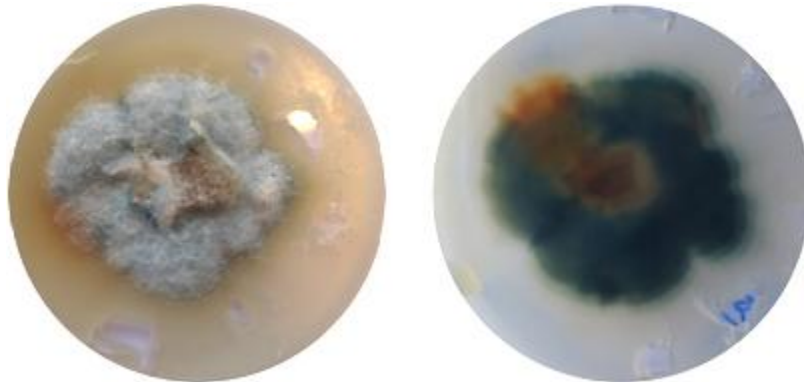
***Fusarium oxysporum*** E.F. Sm. & Swingle

Es cosmopolita y es la especie de *Fusarium* más frecuentemente hallada en el suelo. Como fitopatógeno puede causar diversos síntomas en las plantas, teniendo un amplio rango de hospedero. También fue registrado como patógeno humano. Representa en realidad un complejo de docenas de especies. Ver figura III.31.

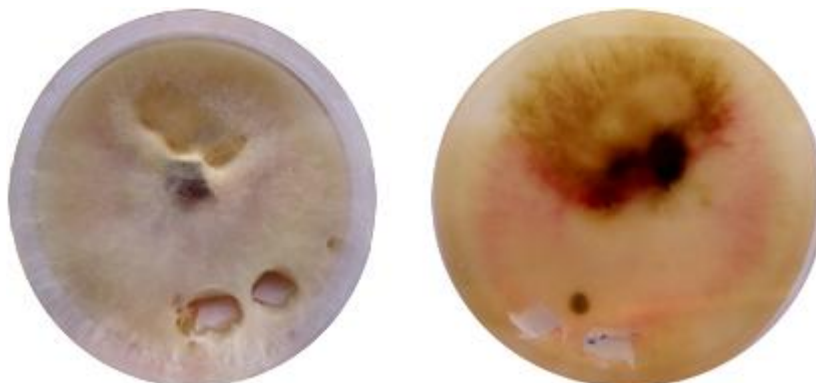


**Figura III.30. Cultivo de *Fusarium incarnatum* en MEA.**

Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.31. Cultivo de *Fusarium oxysporum* en PDA. A la izquierda el anverso y a la derecha el reverso.**



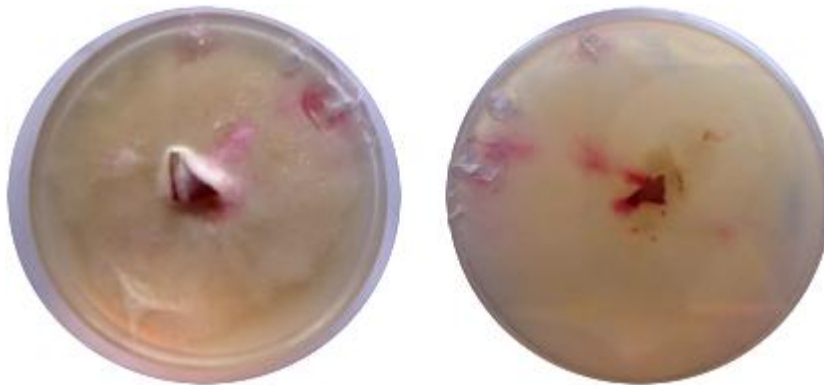
**Figura III.32. Cultivo de *Fusarium sambucinum* en PDA. A la izquierda el anverso y a la derecha el reverso.**



***Fusarium sambucinum*** Fuckel

Es cosmopolita, fitopatógeno de varias familias vegetales. Puede causar canchros, acronecrosis, podredumbre de raíces y de papas almacenadas. Se encuentra en corteza, madera muerta, raíces y papas almacenadas. Conocido ahora por el nombre de su teleomorfo: *Gibberella pulicaris*. Ver figura III.32.

Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.33. Cultivo de *Fusarium tricinctum* en PDA. A la izquierda el anverso y a la derecha el reverso.**

***Fusarium tricinctum*** (Corda) Sacc.

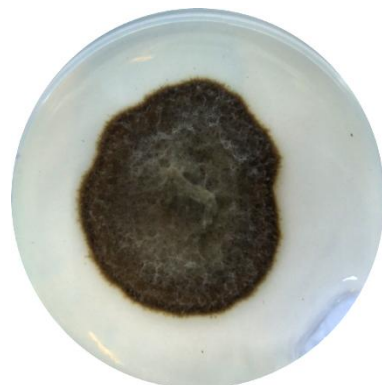
Muy distribuido en ambientes templados, habitante típico del suelo. Puede producir lesiones y podredumbre caulinar, también marchitamiento. Conocido ahora por el nombre de su teleomorfo: *Gibberella tricincta*. Ver figura III.33.

Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Leptostroma* sp.** Fr.

Ver figura III.34.

Clasificación: Rhytismataceae, Rhytismatales, Leotiomyetidae, Leotiomyetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.34. Cultivo de *Leptostroma* sp. en MEA.**

***Mariannaea elegans*** (Corda) Samson

Especie ampliamente distribuida, asociada a suelos y restos leñosos de varias especies hospedaderas. Ver figura III.35.

Clasificación: Nectriaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

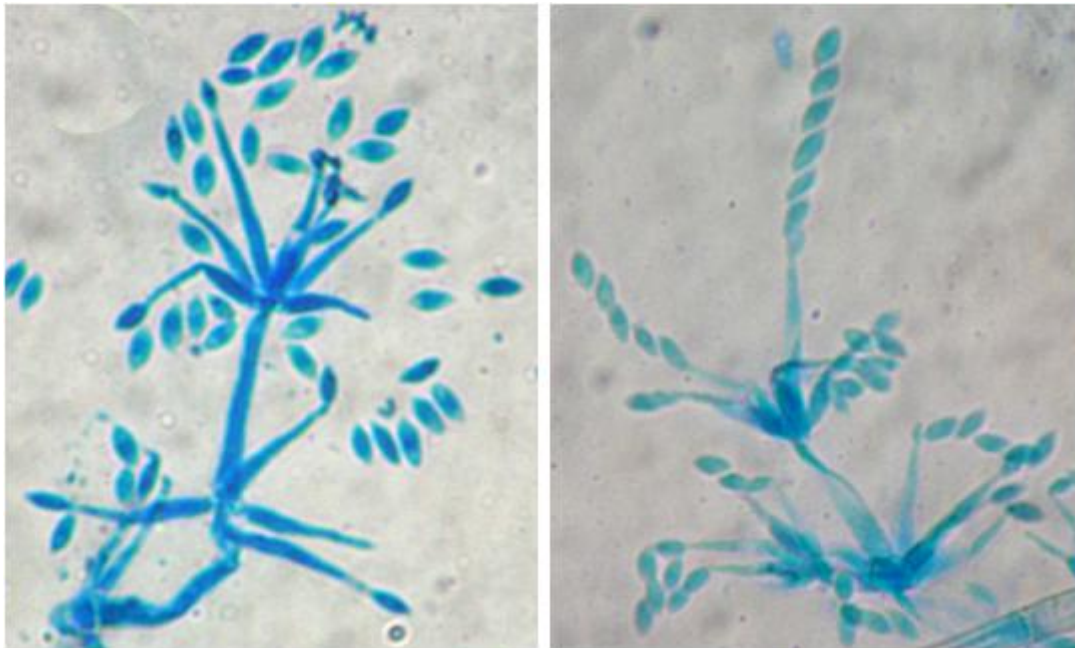


Figura III.35. Fiálides y conidios de *Mariannaea elegans*.

***Microsphaeropsis arundinis*** (S. Ahmad) B. Sutton

Encontrada en China, Pakistán y Uruguay. Ver figura III.36.

Clasificación: Montagnulaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

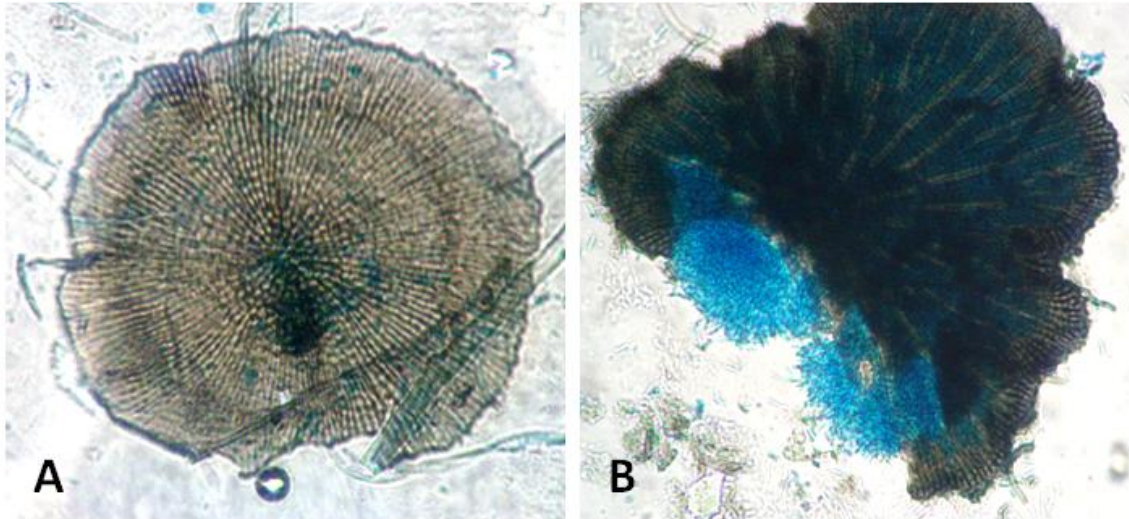
***Mycoleptodiscus* sp.** Ostaz.

Ver figura III.37.

Clasificación: Magnaporthaceae, Magnaporthales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



Figura III.36. Cultivo de *Microsphaeropsis arundinis* en MEA.



**Figura III.37. Esporodocios de *Mycoleptodiscus* sp..** Se observan por su lado basal las células conidiógenas unidas lateralmente que forman el esporodocio. A la derecha un esporodocio roto expone la masa de conidios.

***Paraconiothyrium archidendri*** Verkley, Göker & Stielow

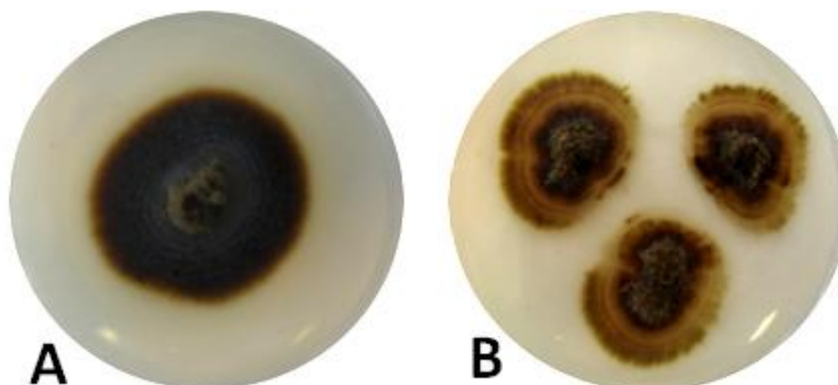
Encontrado en Birmania, en hojas de *Pithecellobium bigeminum* (Fabaceae), causando mancha foliar. Ver figura III.38.A.

Clasificación: Montagnulaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Paraconiothyrium fungicola*** Verkley & Wicklow

Encontrado en Estados Unidos, colonizando un hongo políporo. Ver figura III.38.B.

Clasificación: Montagnulaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.38. Cultivo en MEA de las especies de *Paraconiothyrium*.** A) *Paraconiothyrium archidendri* B) *Paraconiothyrium fungicola*.



***Periconia byssoides* Pers.**

Hongo cosmopolita, hallado en hojas y tallos de múltiples familias hospederas. Puede causar manchas foliares y caulinares, entre otros síntomas.

Clasificación: Incertae sedis, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

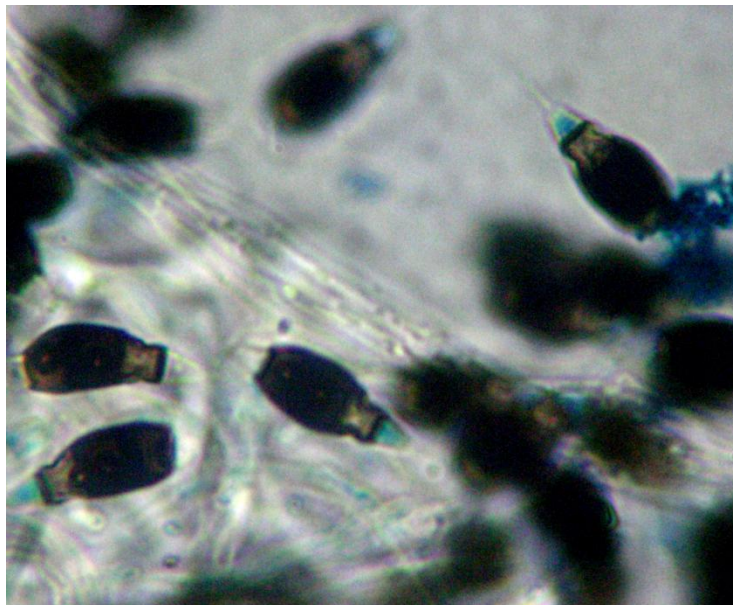
***Pestalotiopsis guepinii* (Desm.)**

Hongo cosmopolita, asociado a múltiples familias hospederas. Puede hallarse como endófito o puede generar síntomas como mancha foliar gris, podredumbre de pétalos, canchales del tallo y acronecrosis de ramas. Ver figuras III.39 y III.40.

Clasificación: Amphisphaeriaceae, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.39. Cultivo de *Pestalotiopsis guepinii* en MEA.**



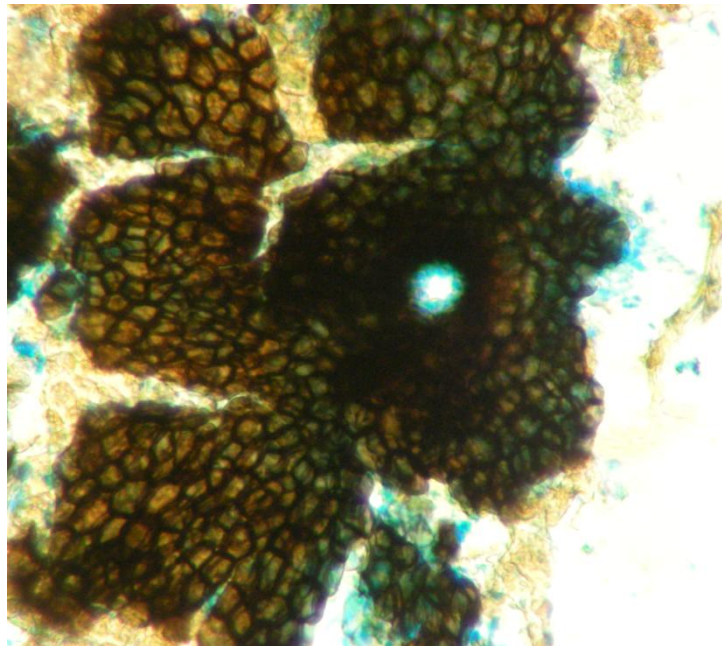
**Figura III.40. Conidios de *Pestalotiopsis guepinii*.**



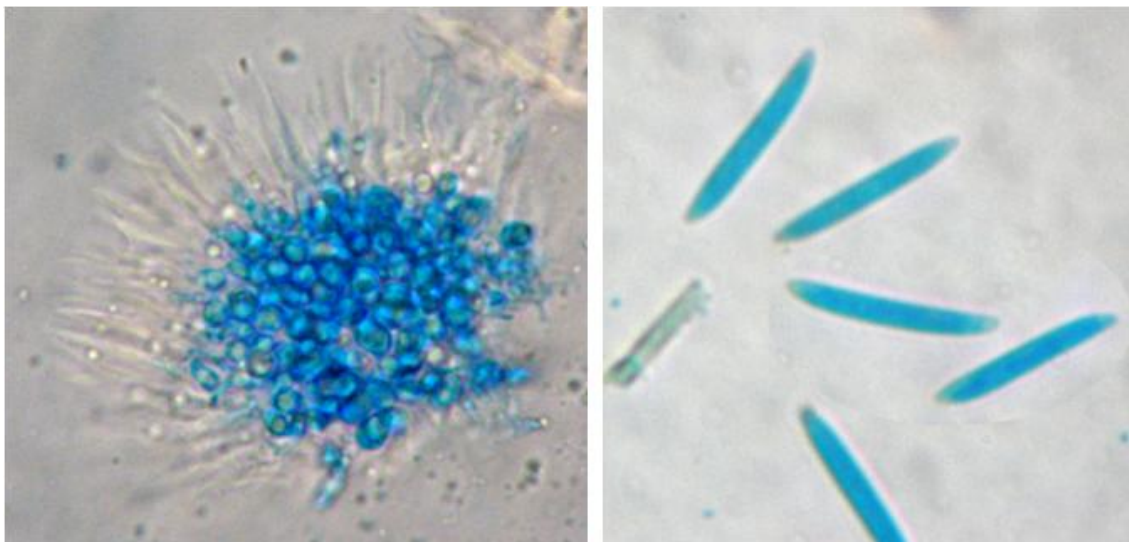
***Pseudoseptoria donacis*** (Pass.) B. Sutton

Encontrada en gramíneas de regiones templadas, forma manchas tipo halo. Ver figuras III.44 y III.45.

Clasificación: Saccoteciaceae, Dothideales, Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.44.** Picnidio de *Pseudoseptoria donacis*. A pesar de estar aplastado se puede apreciar el ostiolo.

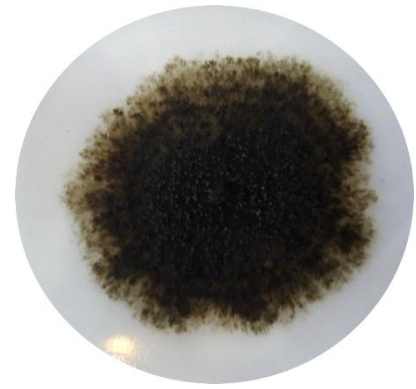


**Figura III.45.** Células conidiógenas y conidios de *Pseudoseptoria donacis*. A la izquierda, células conidiógenas. A la derecha, conidios ( $\approx 21 \times 3 \mu\text{m}$ ).

***Phyllosticta eucalyptorum*** Crous, M.J. Wingf., F.A. Ferreira & Alfenas

Encontrada en África y Sudamérica, en hojas vivas de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae). Ver figura III.46.

Clasificación: Phyllostictaceae, Botryosphaerales, Incertae sedis, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.46. Cultivo de *Phyllosticta eucalyptorum* en MEA.**

***Ramichloridium australiense*** Arzanlou & Crous

Encontrado en hojas de *Musa banksii* (Musaceae) en Australia.

Clasificación: Mycosphaerellaceae, Capnodiales, Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Sarocladium kiliense*** (Grütz) Summerb.

Hongo común del suelo. También conocido por su antiguo nombre *Acremonium kiliense*. Ver figura III.47.

Clasificación: Incertae sedis, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.47. Estructuras de reproducción asexual de *Sarocladium kiliense*. Se observan fiálides largas y cortas formando cabezuelas de conidios ( $\approx 3\mu\text{m}$ )**



***Seimatosporium dilophosporum*** (Cooke) B. Sutton

Encontrado en Oceanía, siempre asociado a Myrtáceas. Su teleomorfo es *Discostroma stoneae*. Ver figura III.48.

Clasificación: Amphisphaeriaceae, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



Figura III.48. Cultivo de *Seimatosporium dilophosporum* en MEA.

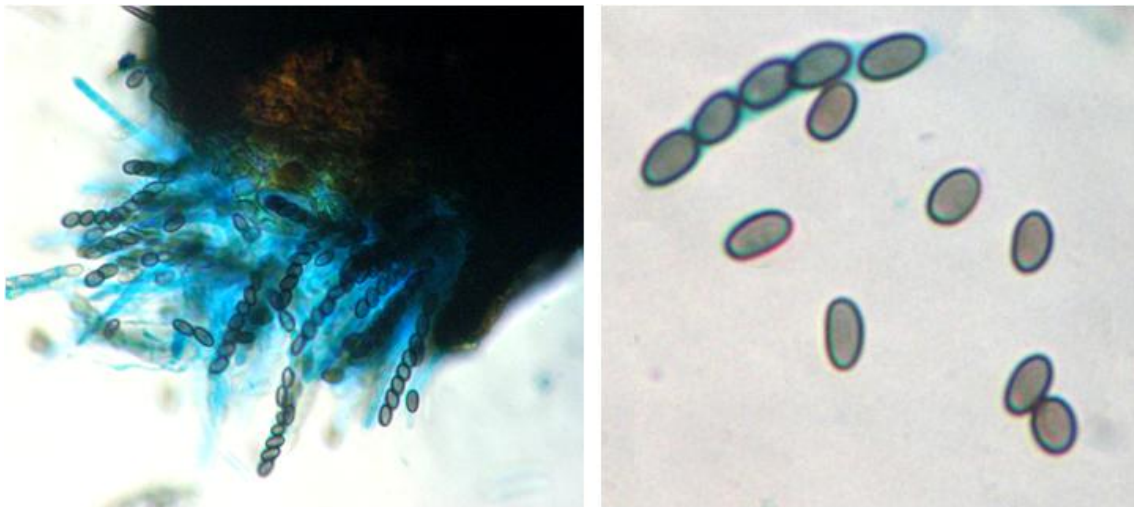


Figura III.49. Estructuras de reproducción sexual de *Sordaria fimicola*. A la izquierda, peritecio roto liberando ascos con ascosporas. A la derecha, detalle de las ascosporas.

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

Hongo cosmopolita, común en estiércol pero también se encuentra asociado a varios hospederos. Ver figura III.49.

Clasificación: Sordariaceae, Sordariales, Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Sphaeropsis sapinea*** (Fr.) Dyko & B. Sutton

Especie cosmopolita, encontrada en varios géneros de Cupressaceae and Pinaceae, en tallos, ramas y acículas. Ver figura III.50.



Figura III.50. Cultivo de *Sphaeropsis sapinea* en MEA.

Clasificación: Botryosphaeriaceae, Botryosphaeriales, Incertae sedis, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Sporidesmium dioscoreae*** M.B. Ellis

Clasificación: Incertae sedis, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Stemphylium botryosum*** Wallr.

Es cosmopolita, puede producir podredumbre negra y tizón foliar. Su teleomorfo es *Pleospora tarda*. Ver figuras III.51 y III.52.



Figura III.51. Cultivo de *Stemphylium botryosum* en MEA.

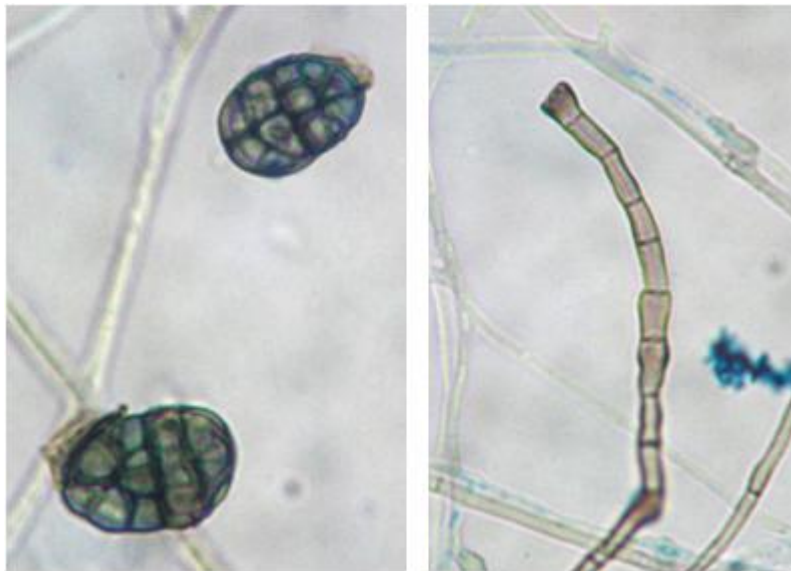


Figura III.52. Estructuras de reproducción asexual de *Stemphylium botryosum*. A la izquierda los dictioconidios y a la derecha una hifa

Clasificación: Pleosporaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Sympodiella* sp.** W.B. Kendr.

Clasificación: Incertae sedis, Pezizomycotina, Ascomycota

***Trichoderma reesei*** E.G. Simmons

Hongo pantropical, en varios tipos de árboles. Su teleomorfo se llama *Hypocrea jecorina*. Ver figura III.53.



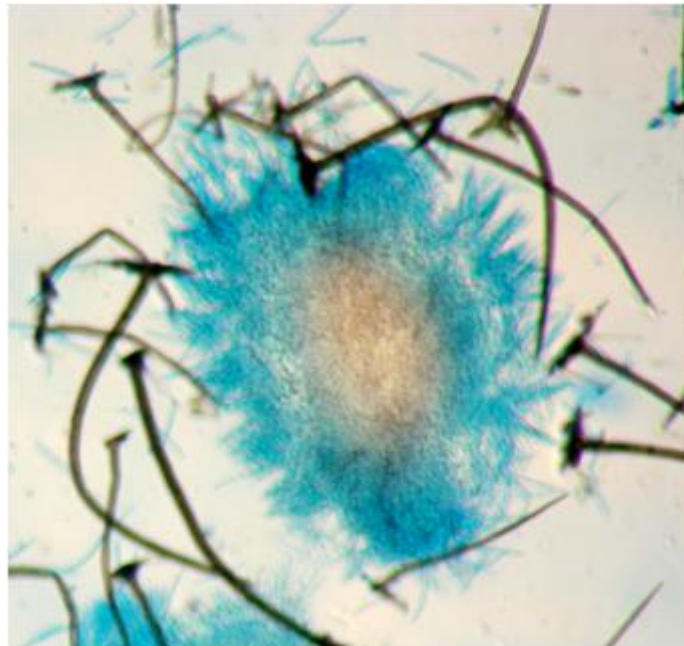
Figura III.53. Cultivo de *Trichoderma reesei* en MEA.

Clasificación: Hypocreaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

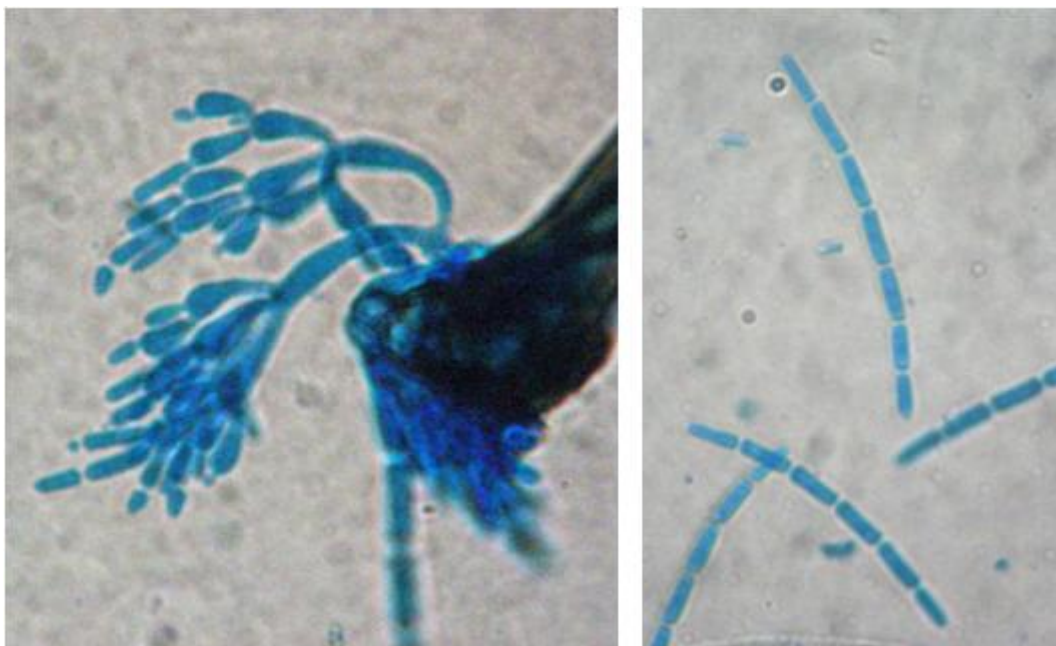
***Wiesneriomyces laurinus*** (Tassi)

Hongo cosmopolita, asociado al mantillo foliar. Ver figuras III.54 y III.55.

Clasificación: Incertae sedis, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.54.** Esporodocio de *Wiesneriomyces laurinus*. Se observa masa de conidios rodeada de setas.



**Figura III.55.** Estructuras de reproducción asexual de *Wiesneriomyces laurinus*. A la izquierda se observan sus filídes y a la derecha los conidios.

***Xylaria* sp.** Hill ex Schrank

Clasificación: Xylariaceae, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota

***Zetiasplozna acaciae*** Crous

Encontrado en hojas de *Acacia melanoxylon* (Fabaceae), en Francia. Ver figura III.56.

Clasificación: Amphisphaeriaceae, Xylariales, Xylariomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota



**Figura III.56. Cultivo de *Zetiasplozna acaciae* en MEA.**



## ANEXO IV

Resultados del análisis con el programa BLAST de las secuencias ITS de los aislamientos fúngicos analizados molecularmente.

**Tabla IV.1. Listado de hongos identificados molecularmente**

Taxones	Coincidencia más cercana	Cobertura	Máxima identidad	Identificación por árbol filogenético
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	<i>Alternaria alternata</i> cepa CHS-4 (KJ082099)	100%	99%	-
<i>Beltraniella</i> sp. 1 Subram.	<i>Beltraniella endlandrae</i> cepa CPC 22193 (KJ869128)	100%	98%	-
<i>Beltraniella</i> sp. 2 Subram.	<i>Beltraniella endlandrae</i> cepa CPC 22193 (KJ869128)	100%	97%	-
<i>Cylindrocladiella elegans</i> Crous & M.J. Wingf.	<i>Cylindrocladiella elegans</i> cepa CBS 114885 (JN943102)	97%	99%	-
<i>Dendrothyrium</i> sp. Verkley & Stielow	<i>Coniothyrium palmicola</i> cepa CBS 161.37 (JX681086)	100%	98%	✓
<i>Diaporthe foeniculacea</i> Niesli	<i>Diaporthe neotheicola</i> cepa ICMP:10075 (KC145914)	100%	100%	✓
<i>Diaporthe infucunda</i> R.R. Gomes, C. Gilenke & Crous	<i>Phomopsis</i> sp. cepa CML 1939 (JN153070)	99%	99%	✓
<i>Diaporthe oxe</i> R.R. Gomes, C. Gilenke & Crous	<i>Diaporthe oxe</i> cepa CBS 133187 (KC343165)	99%	99%	✓
<i>Diaporthe</i> sp. 1 Nitschke	<i>Phomopsis asparagi</i> cepa HB3 (JQ613999)	100%	98%	✓
<i>Diaporthe</i> sp. 2 Nitschke	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> cepa CBS 133180 (NR111862)	99%	99%	✓
<i>Diaporthe terebinthifolii</i> R.R. Gomes, C. Gilenke & Crous	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> cepa LGMF907 (KC343217)	98%	100%	-
Especie perteneciente a Peronosporaceae de Bary	<i>Phytophthora medicaginis</i> x <i>cryptogea</i> cepa P74 (B17)	100%	94%	-
Especie perteneciente a Phaciaceae Fr.	<i>Ceuthospora</i> sp. cepa CLX3539 (KF493754)	100%	99%	-
Especie perteneciente a Phaeosphaeriaceae M.E. Barr	<i>Allantophomopsis lycopodina</i> cepa WA0000019039 (JX981469)	100%	99%	-
Especie perteneciente a Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka	<i>Phaeosphaeria</i> sp. CPC 12130 (KF251196)	95%	97%	-
<i>Leptostroma</i> sp. Fr.	<i>Sordariomycetes</i> no cultivado cepa AWB8 (JX448359)	100%	97%	-
Micelio estéril oscuro 1	<i>Leptostroma</i> sp. cepa 20* (KC354586)	100%	99%	-
<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (S. Ahmad) B. Sutton	Hongo no cultivado cepa HIC6 (JX457096)	98%	94%	-
<i>Paraconiothyrium archidendri</i> Verkley & Stielow	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> cepa CY127	100%	100%	✓
<i>Paraconiothyrium fungicola</i> Verkley & Wicklow	<i>Paraconiothyrium</i> sp. cepa CBS 194.82 (JX496052)	99%	94%	✓
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & B. Sutton	<i>Paraconiothyrium fungicola</i> cepa CBS 113269 (JX496020)	100%	98%	✓
<i>Zetiasplozia acaciae</i> Crous	<i>Sphaeropsis sapinea</i> cepa CIMW 190 (KF766159)	100%	98%	-
	<i>Zetiasplozia acaciae</i> cepa CPC 23421 (KJ869149)	100%	99%	-

## ANEXO V

En este anexo se presentan resultados adicionales del análisis de la diversidad.

**Tabla V.1. Contribución de las especies a la disimilitud de las comunidades de lámina y pecíolo, analizadas por el método indirecto, según el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER)**

Taxones *	Disimilitud promedio	Contribución %	Contribución acumulada %
<i>Phoma</i> sp.	7,275	7,81	7,81
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	7,227	7,759	15,57
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	6,886	7,393	22,96
<i>Fusarium incarnatum</i>	4,799	5,152	28,11
<i>Fusarium sambucinum</i>	4,373	4,694	32,81
<i>Coleophoma crateriformis</i>	4,217	4,527	37,33
<i>Diaporthe foeniculacea</i>	4,073	4,372	41,71
<i>Alternaria alternata</i>	3,831	4,113	45,82
<i>Calonectria insularis</i>	3,694	3,966	49,79
<i>Beltraniella</i> sp. 2	3,417	3,668	53,45

Disimilitud promedio general = 93,15

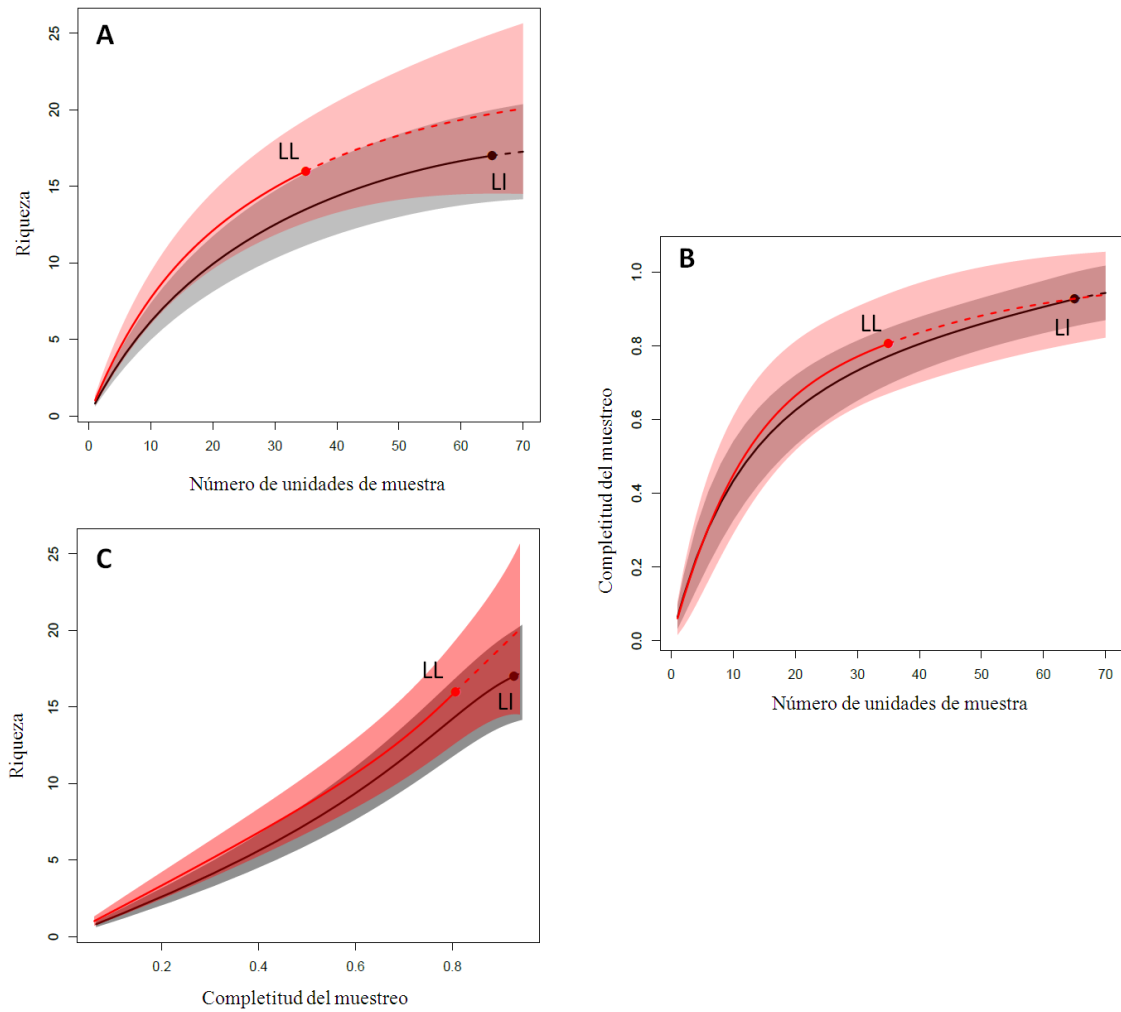
\* Se muestran los taxones que explican hasta el 50% de la disimilitud.

**Tabla V.2. Contribución de las especies a la disimilitud de las comunidades de hoja íntegra y hoja lesionada, analizadas por el método directo, según el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER)**

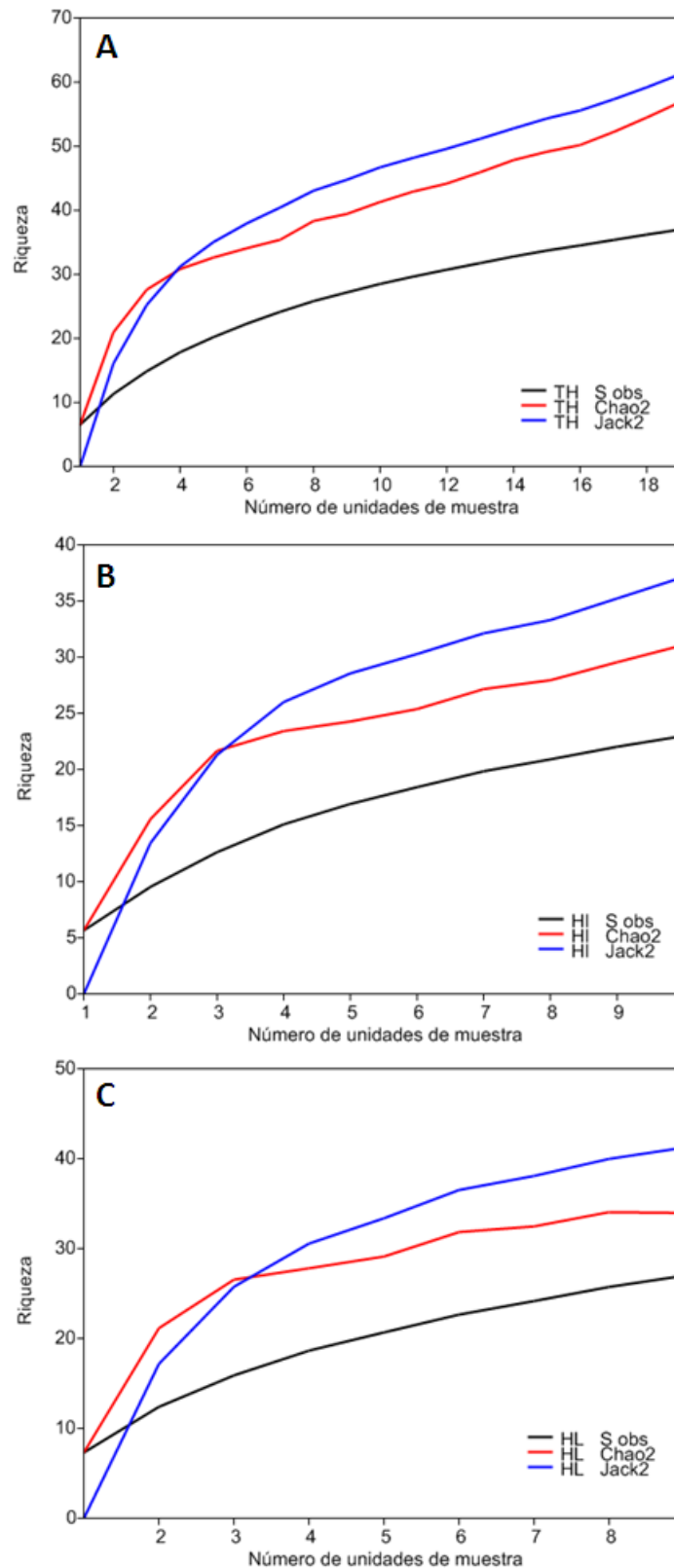
Taxones *	Disimilitud promedio	Contribución %	Contribución acumulada %
<i>Dactylaria eucalypti</i>	5,756	7,484	7,484
<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	4,708	6,121	13,6
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	4,105	5,337	18,94
<i>Alternaria alternata</i>	4,055	5,271	24,21
<i>Dictyochoaeta assamica</i>	3,746	4,869	29,08
<i>Clonostachys rosea</i>	3,673	4,775	33,86
<i>Diaporthe</i> sp.	3,553	4,619	38,48
<i>Wiesneriomyces laurinus</i>	3,316	4,311	42,79
<i>Calonectria insularis</i>	3,21	4,174	46,96
<i>Beltraniella portoricensis</i>	3,182	4,137	51,1

Disimilitud promedio general = 76,92

\* Se muestran los taxones que explican hasta el 50% de la disimilitud.



**Figura V.1. Rarefacción y extrapolación de la riqueza de los subconjuntos de lámina obtenidos por el método indirecto.** De color gris, el subconjunto de lámina íntegra (LI); de color rojo el de lámina lesionada (LL). Las líneas sólidas representan la rarefacción, las líneas punteadas la extrapolación, el punto grueso la muestra de referencia y las regiones coloreadas los intervalos de confianza del 95%. **A)** riqueza en función del esfuerzo de muestreo; **B)** relación entre la completitud y el esfuerzo de muestreo; **C)** riqueza en función de la completitud del muestreo.



**Figura V.2. Desempeño de los estimadores para las comunidades obtenidas por el método directo.** Curvas de acumulación de la riqueza observada (S obs.) y de la estimada (Chao2 y Jackknife2). **A)** para el total de hojas; **B)** para el subconjunto de hojas íntegras; **C)** para el subconjunto de hojas lesionadas.

## ANEXO VI

En este anexo se presenta el inventario modificado de especies endófitas asociadas a pecíolo y lámina de las hojas de *Eugenia uruguayensis* descrito originalmente por Tiscornia *et al.* (2012). Las modificaciones se basan en la identificación de los aislamientos pertenecientes a *Diaporthe* según la reclasificación llevada a cabo por Gomes *et al.* (2013).

**Tabla VI.1. Inventario modificado de hongos endófitos asociados a hojas del guayabo blanco originalmente descritos por Tiscornia *et al.* (2012)**

Aislamientos	Taxones	Frecuencias de incidencia *		
		EL	EP	ET
218	<i>Beltrania rhombica</i>		7	7
239	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1		1
205, 211, 227, 230, 234, 223	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	22		22
221	<i>Coniochaeta velutina</i>		2	2
211'	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	2		2
207	<i>Lentinus tigrinus</i>	1		1
209, 205', 222, 212	<i>Neofusicoccum parvum</i>	3	1	4
201	<i>Nigrospora sacchari</i>	3		3
216, 237	<i>Nigrospora sphaerica</i>		2	2
210	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	1		1
225	<i>Xylaria digitata</i>	2		2
206', 215	<i>Xylaria</i> sp.	7	11	18
202, 213	<i>Diaporthe infecunda</i>	12	63	75
232	<i>Diaporthe</i> sp. 2	11	2	13
206	<i>Diaporthe</i> sp. 3	8		8
204, 224	<i>Diaporthe endophytica</i>	1	1	2
220	<i>Diaporthe oxe</i>		7	7
219	<i>Diaporthe</i> sp. 4		3	3

\* EL, endófitos de lámina; EP, endófitos de pecíolo; ET, endófitos total