

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**COMUNIDAD DE HONGOS ENDÓFITOS EN *Citrus sinensis***

**por**

**Sebastián MARTINEZ KOPP**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2006**

Tesis aprobada por:

Director: -----  
Dra. Lina Bettucci

-----  
Ing. Agr. Alfredo Gravina

-----  
Ing. Agr. Elena Pérez

Fecha: -----

Autor: -----  
Sebastián Martínez Kopp

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mis directores de Tesis, la Dra. Lina Bettucci, Ing. Agr. Alfredo Gravina e Ing. Agr. Elena Pérez por su colaboración y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

A la Dra. Sandra Lupo, por sugerir el tema y enseñarme la mayor parte de lo realizado en este trabajo.

Al Ing. Agr. Jorge Mazziotto, quién brindó las facilidades e información para la realización del muestreo a campo.

A las Lic. en Biol. Raquel Alonso y Sofía Simeto, por su colaboración sobre mis consultas en temas de micología y estadística.

A la Lic. en Biol. Valeria Hein, por las determinaciones de especies de Fusarium.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCION</u> .....	1
2. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u> .....	2
2.1 DEFINICION DE ENDÓFITOS FÚNGICOS.....	2
2.2 INFECCIÓN POR ENDOFITOS.....	3
2.2.1 <u>Patrones espacio temporales</u> .....	7
2.2.2 <u>Patrones espaciales de infección</u> .....	9
2.2.2.1 Variaciones entre sitios.....	9
2.2.2.2 Variación entre árboles en un mismo sitio.....	12
2.2.2.3 Variación dentro de un mismo árbol.....	13
2.2.2.4 Variaciones dentro de las hojas.....	14
2.3. FUNCIONES DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	17
2.3.1 <u>Defensa contra insectos</u> .....	17
2.3.2 <u>Senescencia y abscisión de hojas</u> .....	21
2.3.3 <u>Inducción de cambios químicos en la planta</u> .....	22
2.4 <u>COLLETOTRICHUM</u> .....	25
2.4.1 <u>Estrategias de infección en <i>Colletotrichum</i></u> .....	26
2.4.2 <u>Fuentes de inóculo</u> .....	28
2.4.3 <u>Adhesión de propágulos sobre la superficie vegetal</u> .....	29
2.4.4 <u>Diferenciación de estructuras sobre la superficie vegetal</u> .....	31
2.4.5 <u>Penetración de la superficie vegetal</u> .....	34
2.4.6 <u>Patógenos intramurales subcuticulares</u> .....	36
2.4.7 <u>Desarrollo necrotrófico y reproducción</u> .....	37
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	39
3.1 MUESTREO.....	39
3.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	39
3.3 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS.....	40

3.4 EL GÉNERO <i>COLLETOTRICHUM</i> .....	42
3.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	43
4. <u>RESULTADOS</u> .....	45
4.1 AISLAMIENTOS.....	45
4.2 AISLAMIENTOS DE PARTES DE ÓRGANOS.....	46
4.3 AISLAMIENTOS POR ÓRGANO.....	47
4.4 EL GÉNERO <i>COLLETOTRICHUM</i> .....	49
4.4.1 <u>Características de los grupos morfológicos</u> .....	52
4.5. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA.....	58
4.5.1 <u>Diferencia entre tejidos</u> .....	58
4.5.2 <u>Diferencias entre órganos</u> .....	59
5. <u>DISCUSION</u> .....	61
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	69
7. <u>RESUMEN</u> .....	70
8. <u>SUMMARY</u> .....	71
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	72
10. <u>ANEXOS</u> .....	78

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

<b>Cuadro No.</b>	<b>Página</b>
1. Caracteres utilizados para separar grupos morfológicos de <i>Colletotrichum</i> spp. .....	44
2. Frecuencia relativa de los taxa aislados a partir de las diferentes partes de tejidos de <i>Citrus sinensis</i> .....	48
3. Frecuencia relativa de los taxa aislados a partir de los diferentes órganos de <i>Citrus sinensis</i> .....	51
4. Resultados del estudio morfológico de <i>Colletotrichum</i> spp. por cepa y grupo morfológico.....	53
<b>Figura No.</b>	
1. Características macroscópicas de los diferentes aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidos.....	49
2. Análisis de correspondencia simple de partes de tejidos de acuerdo a la composición de endófitos con frecuencia mayor a 5%.....	58
3. Análisis de correspondencia simple de órganos de acuerdo a la composición de endófitos con frecuencia mayor a 2%.....	60
<b>Tabla No.</b>	
1. Número de fragmentos inoculados según parte de tejido.....	41
2. Número de aislamientos obtenidos por partes de tejido.....	46

## 1. INTRODUCCIÓN

En el Uruguay existen actualmente 21.614 hectáreas plantadas con diferentes especies de cítricos. De esta producción, se destina aproximadamente un 32% a la exportación de frutos frescos, un 39 % a la industrialización y el resto para consumo interno (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2002).

La naranja es la principal especie producida en el país (55%) seguida por la mandarina (33%) y el resto (12%) está constituido por limones, pomelos y otras especies minoritarias (Bruno et al., 2004)

La buena calidad de los frutos es indispensable para asegurar la competitividad de los mismos en el mercado externo. En la calidad de los frutos inciden muchos factores, entre los cuales la presencia de organismos que deterioran la superficie o que ocasionan pudriciones poscosecha constituye una importante causa de descarte.

Muchos de estos organismos son hongos que están presentes en el suelo y en los restos vegetales generados durante la cosecha y poda de los árboles. Otros, ocasionales patógenos, están presentes en forma latente dentro de los tejidos vegetales. La colonización endofítica no es causa de enfermedades por si misma, ya que la enfermedad de una planta es consecuencia de la interacción entre huésped, parásito, vector y ambiente. Sin embargo los factores que inciden en la transición entre la condición endofítica y patogénica de un hongo no es siempre clara (Sinclair y Cerkaskas, 1996).

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig y Saccardo permanece como infección latente debajo de la cutícula de varios frutos. Se mantiene, en la superficie en forma de apresorios antes de que ocurra la maduración del fruto. En Uruguay es un patógeno endémico que frecuentemente es aislado en fruta cítrica. Sin embargo, no se han realizado trabajos con el propósito de conocer cuales son las especies de hongos endófitos que podrían estar colonizando distintas variedades y órganos de los cítricos.

El objetivo general del presente trabajo, fue conocer la población existente de hongos endófitos presente en los distintos órganos y tejidos de naranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] de una plantación comercial.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 DEFINICION DE ENDÓFITOS FÚNGICOS

La definición del término endófito ha suscitado históricamente muchas discusiones. En la presente revisión será tomada la definición dada por Wilson (1993) intentando unificar criterios previamente expuestos por Carroll (1991), Petrini (1991). Esta definición es la más aceptada actualmente y expuesta por Hawksworth et al. (1995).

Los hongos endófitos son aquellos presentes dentro de los tejidos de un vegetal, capaces de causar infecciones asintomáticas, durante una parte o todo su ciclo de vida. Esta definición incluye solo a aquellos organismos que habitan los tejidos de la parte aérea de la planta. Se excluyen así aquellos encontrados en raíces, luego de una esterilización superficial de fragmentos, como se cita en algunos trabajos (Petrini, 1996). En esta definición se incluirá para el presente trabajo la fase asintomática o latente de aquellos hongos que son patógenos durante alguna etapa de su ciclo de vida, como es el caso de *Colletotrichum*. Esta idea, aunque amplia, es la más aceptada en las últimas revisiones sobre el tema (Wilson, 2000). Sin embargo, otros autores han sugerido recientemente la necesidad de separar a los endófitos, como aquellos hongos puramente mutualistas, de los que causan infecciones latentes, netamente parásitos en alguna etapa de su vida (Sinclair y Cerkauskas, 1996). Este concepto es más cercano al tipo de relación existente entre hongos endófitos y gramíneas, difícil de demostrar para hospederos arbóreos (Carroll, 1995). Estos conceptos son aún más difíciles de establecer para *Colletotrichum* ya que recientemente se demostró que la relación mutual, parásita o neutra, para algunas especies de este género, son mediadas por el hospedero (Redman et al., 2001).

Por definición, el término endófito no debe ser usado para referirse a un determinado grupo taxonómico de hongos, ya que estrictamente describe la naturaleza de la interacción entre un hongo y su hospedero vegetal. En términos prácticos, un

endófito fúngico es aquel que puede ser aislado en cultivo puro a partir de material vegetal esterilizado superficialmente (Wilson, 2000).

El estudio de los hongos endófitos ha cobrado gran importancia en las últimas dos décadas debido fundamentalmente a dos razones. Una, la evidencia indica que estos hongos son extremadamente abundantes y diversos en todos los tejidos vegetales estudiados y que poseen transmisión horizontal mediante esporas (Wilson, 2000). Una fracción menor de estos infecta sistemáticamente los tejidos aéreos de gramíneas, mayoritariamente poáceas, y son transmitidos verticalmente mediante hifas que crecen en el interior de las semillas (Saikkonen et al., 1998). Otra razón es que estos hongos tienen la capacidad de producir múltiples toxinas y en ocasiones son capaces de alterar la fisiología y morfología del hospedero. Estas toxinas pueden beneficiar a su hospedero mediante “defensas inducibles” contra la herbivoría, principalmente por insectos, en plantas leñosas (Carroll, 1988, 1991). En el caso de gramíneas, la defensa del hospedero mediante toxinas aparece bajo la forma de “defensa vegetal adquirida” contra la herbivoría tanto de vertebrados como de invertebrados (Cheplik y Clay 1988, Clay 1988).

## 2.2 INFECCIÓN POR ENDÓFITOS

Los endófitos encontrados en especies arbóreas, en contraste con aquellos específicos de gramíneas, son transmitidos horizontalmente vía esporas. No se conocen casos de transmisión directa por semillas del huésped con un desarrollo sistémico en la planta luego de la germinación. Bayman et al. (1998) encontraron para algunas especies de *Xylaria* comunes en los trópicos la posibilidad de transmisión vertical. Algunas especies de hongos endófitos son encontradas ocasionalmente en semillas de su hospedero (Wilson y Carroll, 1994). En estos casos es más probable una infección de la semilla a través de la cubierta seminal que una infección de esta antes de la maduración (Wilson 2000, Lupo et al. 2001).

Wilson y Carroll (1994) observaron la presencia de *Discula quercina* en cotiledones de *Quercus garryana*, desde los cuales eran incapaces de colonizar directamente las plantas emergentes. Sin embargo, en algunas semillas el hongo era

capaz de esporular y así infectar las plántulas emergentes. De esta forma, el hongo es dispersado a través de la semilla si ésta es transportada por algún vector. Lo mismo fue observado para *Cytospora eucalypticola*, colonizadora de cubiertas seminales de *Eucalyptus globulus*. La plántula emergente era tempranamente colonizada cuando alcanzaba 2 cm de altura (Lupo et al., 2001)

Las esporas son por lo general los primeros propágulos viables en este grupo de hongos. Utilizando suspensiones de esporas para infectar tejidos sanos, Stone (1987) demostró la forma en que *Rhabdocline parkeri*, endófito de acículas de *Pseudotsuga menziesii*, es capaz de adherirse, germinar y penetrar en su huésped.

En algunos casos, al menos aquellos en que la relación entre hongo y hospedero es muy estrecha, existen señales químicas muy específicas que inician el proceso de adhesión y germinación (Toti et al., 1992). En especies cosmopolitas, los mecanismos de reconocimiento son mucho menos específicos. No existen estudios que mencionen específicamente la capacidad de las hifas o fragmentos de éstas de iniciar una infección endofítica (Wilson, 2000).

El origen de los propágulos que inician esta relación nunca ha sido completamente estudiado. Para algunos casos existen algunos estudios y para otros se presume que los endófitos esporulan en material vegetal muerto o senescente. Ello se debe a que muchos de estos hongos han sido aislados de hospederos donde no se los ha hallado fructificando (Stone, 1987). Este material, adherido a la planta o en el suelo, esporula y los propágulos son transportados por el viento, agua o insectos hasta tejidos vegetales libres de endófitos. En especies de hojas caducas, los endófitos deben sobrevivir al invierno ya que en ese momento no existen tejidos vivos para colonizar. Por ello es de suponer que éstas especies tienen una gran capacidad saprofítica competitiva o son capaces de colonizar un huésped alternativo hasta que los nuevos tejidos del huésped estén disponibles en la primavera. En cambio, los endófitos que colonizan especies perennes, y por lo tanto poseen follaje para colonizar durante todo el año, no necesitan poseer esa capacidad saprofítica muy desarrollada (Wilson, 2000).

Existen escasos estudios sobre como los hongos endófitos esporulan, sobreviven al medio y sobre su modo de transmisión. Carroll (1995) encontró que

*Rhabdocline (Meria) parkeri* esporulaba en agallas de *Contarinia* sp. en *P. menziesii*, produciendo hasta 1200 esporas por ml. Este hongo además esporula generalmente en acículas caídas, sus esporas se encuentran embebidas en un mucílago, lo cual indica un modo de dispersión mediante el agua. Las acículas jóvenes no son infectadas hasta la época en que ocurren las lluvias (Stone, 1987). *Discula quercina*, que infecta roble blanco, esporula en hojas caídas y es además encontrado en la corteza de ramas jóvenes, donde se presume que también es capaz de esporular. Muestras de lluvia colectada bajo el huésped, contienen hasta 50 esporas de *D. quercina* por ml de agua (Wilson y Carroll, 1994).

El agua de lluvia es uno de los principales vehículos de dispersión de los hongos endófitos y así el volumen de precipitación está directamente relacionado con el nivel y volumen de infección (Wilson y Carroll, 1994). La infección por *D. quercina* en roble blanco y de *Ophiognomonium cryptica*, *Plectophomella* sp. y *Asteromella* sp. en *Quercus emoryi*, se redujeron o desaparecieron al cubrir las ramas con películas plásticas protectoras de la lluvia (Wilson, 1996).

Sin embargo, la lluvia no es el único medio de dispersión empleado por estos hongos. Muchas especies que producen esporas hidrofóbicas son mayoritariamente dispersadas por el viento o por animales (Malloch y Blackwell, 1992). La permanencia de algunas especies de hongos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aureobasidium*, que aparecen en bajo porcentaje como endófitos de gran variedad de hospederos y que producen esporas secas (no en mucílago), fue similar en los testigos sin cobertura plástica, que en aquellas hojas protegidas con una cobertura plástica (Wilson, 1996). Debido a que estos hongos son dispersados por el viento o animales, es posible que su presencia se deba a que les fue posible atravesar la barrera de la funda plástica por la abertura de la base.

Cuando el inóculo alcanza un substrato compatible, las condiciones ambientales son las que determinan si la infección tendrá lugar. Por ejemplo, *D. quercina* y *D. umbrinella*, cuyos hospederos son *Quercus garryana* y *Fagus sylvatica* respectivamente, infectan a sus hospederos en las condiciones controladas de un invernáculo (Viret y Petrini 1994, Wilson y Carroll 1994). Cuando fueron utilizadas suspensiones de esporas para infectar sus hospederos en campo, en condiciones

húmedas y frescas, los niveles de infección fueron altos. Por el contrario, cuando el mismo procedimiento fue utilizado para inocular durante los meses secos y cálidos de verano, los niveles de infección fueron significativamente bajos (Wilson, 2000).

Varios intentos de infección experimental de tejidos ya colonizados han dado resultados negativos debido a los factores propios de las plantas, más que a las condiciones ambientales no favorables. Por ejemplo, al intentar inocular plantas con suspensiones de esporas a concentraciones de varios órdenes de magnitud mayores a las normales, los niveles de contaminación fueron similares a la infección natural. Esto indica que factores propios de la planta son capaces de controlar, o regular, los niveles de contaminación (Wilson, 2000).

Los hongos endófitos pueden ingresar a los tejidos vegetales sanos por heridas provocadas por insectos o por daño mecánico (Faeth y Hammon, 1997c). Esto ha sido corroborado para varias especies, entre ellas las correspondientes a endófitos de *Quercus emoryi*, pero no parece ser una generalidad debido a que muchos endófitos no responden de la misma manera (Wilson, 2000). Los endófitos más cosmopolitas parecen verse favorecidos en su infección por las heridas, no así *Ophiognomonia cryptica*, conocida solo de *Quercus* y que es menos abundante en heridas (Wilson y Carroll, 1997). Así como proveen de una vía de entrada, las heridas pueden inducir en un endófito la transición desde su fase latente hasta una etapa de crecimiento activo (Fail y Lagenheim, 1990).

Las esporas son generalmente los propágulos infectivos de la mayoría de las especies de hongos endófitos, transmitidos horizontal y pasivamente mediante lluvia, viento o animales. Luego de la infección, el endófito permanece latente hasta que la senescencia, abscisión o daño de los tejidos le permiten desarrollarse y en oportunidades esporular. Si los tejidos no están disponibles permanentemente para la infección, como en las especies de hojas caducas, los hongos permanecen en hojas muertas o colonizan la corteza hasta poder infectar tejidos nuevos. En especies de hojas perennes, los endófitos colonizan repetidamente a su hospedero y no son capaces de sobrevivir por largos períodos fuera de su hospedero (Wilson, 2000).

### 2.2.1 Patrones espacio temporales

En la mayoría de los estudios sobre endófitos se han investigado las variaciones de éstos dentro de un mismo año. En la mayoría de los hospederos perennes es posible conocer la distribución temporal para inferir variaciones debido a que en un mismo momento se pueden encontrar hojas de diferente edad.

Las hojas jóvenes, aún en yemas, son generalmente libres de endófitos debido a que aún no han sido expuestas al inóculo de éstos (Wilson y Carroll, 1994). En el caso de hojas no desarrolladas de *Euterpe oleracea*, una palmera tropical, se encontró que la colonización por endófitos era común, aunque en proporción mucho menor que en el caso de hojas desarrolladas (Rodrigues, 1994).

Los niveles de infección generalmente aumentan a medida que aumenta la edad del hospedero debido a que las hojas se expanden y con ello es mayor la superficie expuesta a la infección. En estudios en que los muestreos fueron repetidos en más de una estación, el incremento cualitativo fue similar de una estación a otra (Wilson, 2000).

En pino se encontró que en las acículas jóvenes, de hasta un año de edad, los niveles de infección aumentaban a lo largo de la temporada, en tanto esto no ocurría en las acículas viejas de hasta 5 años (Helander et al., 1994).

Faeth y Hammon (1997a) encontraron un aumento inicial de la frecuencia de endófitos en hojas de *Quercus emoryi*, aunque con el tiempo los valores se estabilizaron para la mayoría de las especies. Wilson y Carroll (1994) encontraron que la frecuencia de colonización por *Discula quercina* en *Quercus garryana* aumentaba progresivamente durante la primera mitad de la vida de las hojas, y que descendía hacia el momento de la abscisión. Por el contrario, Rodrigues (1994) encontró efectos variables a través del tiempo en la frecuencia de endófitos existentes en *Euterpe oleracea* (Palmae), pero sin un patrón claro durante el transcurso de la temporada. En *Q. garryana*, la infección por *Asteromella* sp. y otros hongos cosmopolitas, luego de la apertura foliar, aumentaron. Mientras tanto, *Plectophomella* sp. permaneció con valores bajos y constantes y no pudo detectarse la presencia de *Ophiognomonina cryptica* (Wilson, 2000). Durante el verano, la presencia de todas las especies descendió

abruptamente para aumentar levemente al final de esta estación. Al inicio del invierno, la frecuencia de todas las especies aumentó considerablemente y *O. cryptica* fue detectada por primera vez, siendo luego la especie más común hasta el momento de abscisión foliar (Wilson, 2000). Gaylord et al. (1996) notaron un aumento constante de la frecuencia de endófitos a través de la temporada en hojas de *Quercus gambelii*, que es semejante a un patrón exponencial de distribución de esta población.

Las variaciones de los patrones de colonización y de especies dentro de una misma temporada encontradas en diferentes estudios son muy variables. Estas diferencias se pueden explicar en términos de las variaciones existentes en los niveles de precipitación y otros factores ecológicos ocurridos en los sitios de estudio (Wilson, 2000).

Según estudios realizados sobre poblaciones de hongos epifitos pueden inferirse conclusiones sobre como varían las poblaciones endófitas (Kinkel, 1991). Por ejemplo, las poblaciones de hongos endófitos no dependen de: a) la reproducción, ya que estos hongos generalmente no se reproducen desde su hospedero vivo, aunque pueda existir cierto desarrollo vegetativo desde algún órgano, o b) emigración, ya que no se conoce endófito que abandone su hospedero vivo para reinfectar otro sitio (Wilson, 2000). Por su parte, el grado de inmigración depende del nivel de inoculo y de la existencia de condiciones que favorezcan la infección. Así, la incapacidad para infectar un hospedero, resultante de la falta de condiciones favorables para ello, es un fenómeno vinculado a la inmigración. No se considera un fenómeno de extinción ya que antes de infectar a su hospedero, un hongo no es parte de la población de endófitos. Existe cierta evidencia de que las poblaciones de endófitos tienen una vida larga en su hospedero y que a su vez, están sujetos a extinción. Wilson (2000) encontró niveles significativos de descenso en las poblaciones de endófitos en el verano de Arizona, cuando las temperaturas máximas exceden los 38 °C y la radiación solar es extrema. Este fenómeno fue atribuido a que los niveles de extinción de individuos excedieron notoriamente al nivel de inmigración. Esto sugiere que la desaparición de individuos fue dada por las condiciones ambientales extremas, las que a su vez no permitieron la reposición con nuevos individuos al no existir precipitaciones.

En el caso de hongos que son dispersados mediante agua, las variaciones anuales en la precipitación causa notorias diferencias temporales de infección. Sin embargo, estos efectos son marcadamente más notorios al considerar la acumulación de precipitación a lo largo de la estación ya que una población de endófitos está compuesta por una acumulación de infecciones ocurridas a través de la temporada (Wilson, 2000). Las condiciones exactas que favorecen una infección sobre un hospedero vivo son desconocidas, aunque las temperaturas cálidas, la humedad y la baja radiación ultra violeta favorecen el crecimiento e infección fúngica. Las precipitaciones acumuladas, como demostraron Wilson y Carroll (1994), juegan un papel importante en el aumento de los niveles de infección, la que prácticamente desaparece en la temporada seca de verano. Para el caso ya citado de *O. cryptica* en *Q. emoryi*, la presencia de este endófito coincide exactamente con un descenso de la temperatura y la radiación solar en invierno (Wilson, 2000). En forma similar, el grado de infección de acículas de *Pseudotsuga menziesii* por endófitos coincide exactamente con el nivel de precipitaciones (Bernstein y Carroll, 1977).

## 2.2.2 Patrones espaciales de infección

Escasos son los estudios existentes vinculados a las variaciones espaciales en la colonización de plantas por hongos endófitos. Sin embargo, existen estudios vinculados al estudio de la distribución temporal de endófitos. El primero en exponer y revisar estos aspectos en términos de variación espacial fue Carroll (1995). Posteriormente los conocimientos vinculados a las variaciones espaciales fueron retomados en forma similar por Wilson (2000).

### 2.2.2.1 Variaciones entre sitios

Determinado hospedero es colonizado habitualmente por un conjunto cualitativamente similar de hongos endófitos en todo su rango de distribución natural. La abundancia relativa de una especie en particular puede variar dependiendo de la localidad (Fisher et al., 1994).

Rollinger et al. (1993) encontraron que tanto la presencia de especies como su frecuencia en acículas de *Sequoia sempervirens*, fue prácticamente similar en seis sitios de muestreo a lo largo de una transecta de 850 km en una zona de distribución natural de esta especie.

Fisher et al. (1994) notaron que las comunidades de endófitos en hojas de *Quercus ilex* de árboles que crecían en dos lugares geográficos distantes y nativos para esta especie, Mallorca y Suiza, diferían notoriamente de las comunidades de árboles que crecían en Inglaterra, en donde esta especie fue introducida. Asimismo, aunque las comunidades de Mallorca y Suiza podían separarse una de la otra, ambas eran significativamente diferentes de las comunidades encontradas en los árboles de Inglaterra.

En un estudio similar, en *Eucalyptus nitens* Maiden, se encontró que las comunidades provenientes de Australia, sitio de origen del hospedero, fueron notoriamente diferentes de aquellas provenientes de Inglaterra, donde los eucaliptos fueron introducidos (Fisher et al., 1993). Además, los eucaliptos que crecían en Inglaterra tenían una diversidad mucho menor y albergaban una comunidad de especies en su mayoría cosmopolitas que aquellos de Australia. En un estudio posterior, también en *E. nitens* y vinculado a la presencia endófito del patógeno *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. y De Not., Smith et al. (1996) encontraron una comunidad muy similar a la reportada previamente para Australia en Sudáfrica. En la otra especie analizada, *E. grandis*, las comunidades encontradas en árboles provenientes de dos sitios geográficos diferentes en Sudáfrica, fueron similares para ambos sitios. En Uruguay las comunidades endofíticas de ramitas de *E. globulus* plantadas en el litoral oeste presentaban diferencias en la composición con aquellas provenientes del sureste (Bettucci et al. 1997, Bettucci et al. 1999).

En los sitios de origen de una especie pueden existir marcadas diferencias en las comunidades encontradas y generalmente este fenómeno es atribuido a las diferencias en las prácticas de manejo de un área determinada. Sieber-Canavesi y Sieber (1987) encontraron un mayor número de especies en las comunidades de acículas de *Abies alba* proveniente de sitios en los que se había realizado una tala de

limpieza, que en aquéllas provenientes de árboles cultivados. En este y otros casos es difícil determinar las diferencias debidas a la diversidad genética del monte.

Se ha demostrado que las diferencias genéticas son capaces de influir en la colonización por endófitos ya que generalmente los árboles cultivados poseen menor diversidad genética que aquellos que se encuentran en su ambiente natural (Todd, 1988).

Las causas de estas diferencias entre sitio no han sido completamente determinadas. Muchas de estas complicaciones surgen por las dificultades metodológicas del muestreo o por realizarse muestreos demasiado pequeños. Cuando el muestreo es pequeño por limitaciones del ensayo, las diferencias existentes entre pocos árboles pueden ser muy grandes y no representar fehacientemente las diferencias en la población estudiada (Wilson, 2000).

Las diferentes comunidades encontradas entre sitios pueden ser causadas por las diferencias entre los ambientes naturales y aquellos a los que una especie vegetal fue introducida. En los casos anteriormente citados, las interpretaciones no pueden ser tomadas estrictamente cuando se estudian solo unos pocos individuos. Sin embargo, puede deducirse que si una especie de hongo endófito muestra gran afinidad por su hospedero y este es cultivado en un lugar donde no existe inóculo de ese hongo, el hospedero será colonizado por endófitos más generalistas, como *Alternaria* o *Cladosporium*, como ha sido observado en las comunidades de endófitos de *E. globulus* y *E. grandis* en Uruguay (Bettucci y Alonso 1997, Bettucci et al. 1997). Las bajas incidencias en la colonización por hongos cosmopolitas en el sitio de origen de un hospedero, puede atribuirse a la exclusión ejercida por los endófitos más especializados, ya que los cosmopolitas también existen en esos sitios. Este es el mismo mecanismo de exclusión documentado repetidas veces para organismos macroscópicos (Wilson, 2000). Wilson (1996) encontró que cuando los endófitos específicos y especializados eran excluidos de su hospedero, *Quercus emoryii*, éste era infectado mayoritariamente por hongos cosmopolitas poco especializados. Si esta exclusión es mediada por el hospedero, el hongo o la interacción, es desconocido pero será retomado para el caso específico de *Colletotrichum* en el cual ha sido determinado el control de la simbiosis o el parasitismo (Redman et al., 2001).

#### 2.2.2.2 Variación entre árboles en un mismo sitio

La variación entre comunidades de endófitos también puede ocurrir entre árboles en un mismo sitio. Sin embargo, esta variación está dada en términos del nivel relativo de infección más que en la presencia de una determinada especie.

Por ejemplo, Helander et al. (1994) encontraron que los niveles de infección por endófitos en acículas de pino variaban entre árboles individuales, pero las especies más abundantes eran comunes a todos los árboles. Esta variación fue interpretada como debida a las diferencias en densidad de individuos en las parcelas estudiadas, ya que en las parcelas con mayor densidad de individuos la colonización por endófitos era más alta. Wilson y Faeth (2001) encontraron una variación considerable en la densidad de infección pero no de especies en individuos de *Quercus emoryi* en un sitio. Parte de esta variación es explicada por las diferencias en el tamaño de hoja entre árboles, las hojas pequeñas tenían una mayor densidad de infección que las grandes. De esta forma, los árboles que poseían hojas más pequeñas también poseían mayores niveles de infección por hongos endófitos. Por otra parte, Todd (1988) demostró que la componente genética del hospedero determina significativamente la variación entre árboles en los niveles de infección por endófitos.

La mayoría de los estudios que analizan la variación en las comunidades endófitas entre árboles, muestran una mayor variación en la frecuencia de infección por endófitos entre árboles, pero con menor número de especies presentes. Este fenómeno no es extraño ya que es una constante en muchos grupos de organismos parásitos en su respectivo hospedero. Al igual que para otros organismos, las condiciones ambientales como la distancia desde el inoculo, el clima o microclima del hospedero, la humedad, temperatura y otros eventos, son todos responsables de alterar al árbol como hospedero y así afectar la colonización por hongos (Wilson, 2000).

El genotipo, y presumiblemente la interacción genotipo-ambiente, pueden también afectar al árbol como hospedero para los endófitos en una forma análoga a

como el genotipo del hospedero afecta a la susceptibilidad de una planta a un patógeno o de un animal a un parásito (Wilson, 2000).

En *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*, Elamo et al. (1999) estudiaron la variación en la frecuencia de endófitos foliares entre árboles provenientes de distintas familias o accesiones de semillas. La frecuencia del endófito más común aislado de esas hojas, *Fusicladium* sp., fue significativamente afectado por el origen de la semilla de sitio a sitio. En cambio, *Melanconium* sp., otro de los endófitos aislado con alta frecuencia, mostró variación en la frecuencia de aislamiento según el origen de las plantas y el sitio de muestreo.

#### 2.2.2.3 Variación dentro de un mismo árbol

La variación en la infección por endófitos en un mismo árbol ha sido estudiada a diferentes alturas de la canopia, dirección de las ramas y distancia desde el tronco. En los estudios en que fueron encontradas diferencias, se ha dado la generalidad de que las frecuencias de infección disminuyen conforme aumenta la altura en el árbol (Johnson y Whitney, 1989).

La dirección cardinal de las ramas parece no tener efecto alguno en cuanto a las diferentes comunidades encontradas (Johnson y Whitney 1989, Legault et al. 1989, Fisher y Petrini 1990). Por ejemplo, Petrini y Fisher (1990) estudiaron ramas de *Quercus robur* tomadas de diferentes direcciones en un estudio en busca de comunidades específicas. Estas ramas estaban colonizadas por comunidades similares, no pudiendo encontrarse influencia de la dirección sobre la colonización.

Otros estudios indican que las densidades de infección son mayores en el follaje externo más joven con respecto a las hojas más viejas e internas en el árbol. Igualmente, es prematuro obtener conclusiones de tan pocos trabajos en este aspecto, sobre todo con respecto a los factores que determinan estos resultados (Wilson, 2000).

Las hojas que se encuentran en la parte superior del árbol son las más alejadas del inóculo y de esta manera es esperable una menor frecuencia de colonización por parte de los hongos endófitos. Asimismo, las condiciones que afectan la deposición de esporas y la infección son menos favorables en las partes superiores de los árboles. La

lluvia es más violenta en el follaje superior, provocando un lavado de esporas, la radiación ultra violeta es mas alta y la humedad menor (Wilson, 2000).

La falta de efectos ocasionados por la dirección del hospedero fue señalada por Johnson y Whitney (1989), Legault et al. (1989). La cobertura de ramas por líquenes o musgos depende en gran medida de la dirección de esas ramas y un resultado similar podría esperarse para la colonización por hongos endófitos. En los estudios citados no se encontraron diferencias entre comunidades provenientes de ramas con diferente orientación.

En cuanto a la exposición de las ramas a la luz se encontró, en *Quercus emoryii*, que las hojas externas o iluminadas presentaban mayores densidades de infección que las internas o sombreadas en la etapa tardía en la temporada (Wilson y Faeth, 2001). Estos resultados fueron interpretados como dependientes del tamaño de hoja, ya que las hojas expuestas al sol eran menores con respecto a las que se encontraban a la sombra. Además, la densidad de infección y el área foliar estaban inversamente correlacionadas en la mayor parte de la temporada. Por el contrario, al inicio de la estación, las hojas a la sombra tenían mayores densidades de infección que las hojas al sol. Durante la primavera y verano, las hojas expuestas al sol tenían también una mayor exposición a la radiación ultra violeta, condición que inhibe la infección endofítica. Luego del verano, las densidades de infección en hojas expuestas al sol, aumentaron con respecto a aquellas hojas a la sombra (Wilson, 2000).

#### 2.2.2.4 Variaciones dentro de las hojas

Se han encontrado variaciones en los patrones de colonización dentro de una misma hoja, pero son distintas dependiendo de la especie de hospedero. El patrón general de distribución o gradiente de infección por endófitos, indica que una mayor frecuencia de colonización es esperada en la zona axial, cercana al pecíolo, que en la zona distal de la hoja. Esto es general, tanto en acículas de coníferas (Bernstein y Carroll 1977, Sieber-Canavesi y Sieber 1987), como en hojas de angiospermas (Wilson y Carroll, 1994). Legault et al. (1989) encontraron este fenómeno solo en acículas de hasta un año de edad, pero no en aquellas más viejas. Sin embargo, Hata y Futai

(1996) encontraron lo contrario para acículas de diversas especies del género *Pinus*. También se ha descrito la ausencia de patrones en las comunidades endófitas dentro de hojas (Sieber y Hugentobler, 1987), o una distribución diferencial de especies dentro de una misma hoja (Hata y Futai, 1996).

En *Manilkara bidentata* (A. DC.) A. Chev., una especie de distribución neotropical, Lodge et al. (1996) estudiaron las comunidades de hongos endófitos existentes en hojas y pecíolos. Se obtuvieron aislamientos en aproximadamente un 95% de los fragmentos provenientes de hojas y en un 100% de los fragmentos de pecíolos. De las más de 20 especies aisladas, más del 50% de estos aislamientos pertenecían a especies de *Xylaria*, un género muy abundante en las zonas tropicales y que aparece en un amplio rango de hospederos. De las restantes especies, solo un par de ellos se supone son específicas de este hospedero. Este resultado es coincidente con otros que indican que en ambientes tropicales la abundancia de endófitos es mayor, particularmente Xylariaceae, y la especificidad menor que en otros climas (Rodrigues, 1994). La abundancia de especies en pecíolos fue muy diferente de la encontrada en hojas y la ausencia de *Xylaria* indica que este grupo de hongos no coloniza las hojas desde las ramas sino desde el exterior (Lodge et al., 1996). Si bien esto es muy probable, en Uruguay se ha encontrado lo contrario para Myrtaceae nativas (Bettucci et al., 2004).

Wilson y Carroll (1994), han observado que la frecuencia de infección por *Discula quercina* en hojas de *Quercus garryana* seguían una tendencia lateral. Los discos provenientes de la lámina foliar estaban menos infectados que los discos de la nervadura central adyacente. Además existía un gradiente desde el extremo distal de la hoja hacia el pecíolo y todo a lo largo de la lámina y de la nervadura central. Se supone la deposición diferencial de esporas y la expansión diferencial de la lámina podrían explicar este fenómeno.

Las esporas de muchos hongos endófitos son dispersadas por el agua de lluvia y algunas partes de la hoja tienen un mayor contacto con dicha agua, por ejemplo aquellas partes que la canalizan. Asimismo, las características de las hojas, tales como la posición y densidad de tricomas, que influyen sobre la deposición de esporas, podrían explicar estos patrones de infección (Wilson, 2000). El agua es canalizada a

través de la nervadura central y hacia la base de la hoja adyacente al pecíolo. En *Q. garryana*, la densidad de tricomas es mayor en la nervadura que en la lámina y en el extremo axial que en el distal (Wilson y Carroll, 1994). Es conocido que los tricomas actúan como trampas de esporas para ciertos hongos patógenos (Allen et al., 1991). Puede tomarse como generalidad que las esporas de los hongos endófitos pueden ser depositadas diferencialmente sobre las hojas, provocando mayores frecuencias de infección en determinadas áreas (Wilson, 2000).

Las infecciones dentro de la lámina reflejan una sucesión de infecciones a lo largo del tiempo. Una infección puede ocurrir cuando aún la hoja no se ha expandido completamente y así la posición relativa del endófito puede cambiar conforme la lámina vaya expandiéndose. Para el caso de *Q. garryana*, la zona central y la distal de la lámina se expanden en mayor medida que otras partes. Así, las infecciones pueden ser diluidas en esa zona y las densidades de infección pueden disminuir debido a esta expansión diferencial (Wilson y Carroll, 1994).

Algunas especies vegetales canalizan el agua hacia la parte distal de la hoja, por ejemplo las especies con hojas mucronadas, y por ello la densidad de infección por hongos endófitos será mayor en la parte distal. Entonces en las especies vegetales que poseen hojas incapaces de canalizar el agua de lluvia y que no poseen una distribución diferencial de tricomas, es de suponer que no tendrán patrones característicos en la distribución de sus endófitos (Wilson, 2000). A una escala mucho más pequeña los endófitos dentro de la hoja son capaces de ocupar sitios extremadamente localizados y no crecer fuera de esa zona, al menos durante su fase latente (Stone 1987, Wilson y Carroll 1994).

Luego de la penetración los hongos endófitos pueden quedar restringidos a la capa epidérmica, como es el caso de *Rhabdocline parkeri* en acículas de *Pseudotsuga menziesii*, o localizarse en la zona intercelular de la epidermis o en posición subcuticular, como es el caso de *Discula umbrinella* en hojas de *Fagus sylvatica* (Viret y Petrini, 1994). Los estudios microscópicos han mostrado que los sitios de infección son discretos y altamente localizados. Inoculaciones artificiales de *D. quercina* en *Q. garryana* mostraron que el endófito solo pudo reaislarse de las zonas de la hoja en que se había aplicado la suspensión de esporas y nunca de las zonas adyacentes. Pero

cuando un hongo coloniza tejidos dañados, el sitio de infección no es tan localizado como en el caso de la infección en tejidos sanos. Posteriormente, el hongo es capaz de colonizar los tejidos adyacentes, asociado o no al inicio de los procesos de abscisión (Wilson, 2000).

### 2.3 FUNCIONES DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Se especuló que una de las funciones de los endófitos foliares es el antagonismo frente a insectos, luego del descubrimiento de la defensa otorgada por estos hongos a las gramíneas frente a herbívoros vertebrados e invertebrados (Carroll, 1988). Experimentos posteriores fundamentaron, en un principio, esta hipótesis sobre el rol ecológico cumplido por los endófitos foliares. Actualmente la diversidad encontrada y la variación en los resultados obtenidos con respecto a sus similares en gramíneas, han cuestionado su función como antagonistas de insectos (Saikkonen et al., 1998).

Según Wilson (2000), es apresurado con los escasos estudios realizados interpretar las funciones que podrían cumplir este grupo de hongos, y considerarlos en conjunto por ocupar un mismo nicho. Sería mucho más exacto considerar que diferentes especies son capaces de realizar diferentes funciones dependiendo del hospedero en el que se encuentren y como interactúan.

#### 2.3.1 Defensa contra insectos

La defensa contra insectos ha sido la hipótesis más difundida sobre la función cumplida por los endófitos fúngicos en sus hospederos arbóreos (Carroll 1988, 1991, Wilson 1993).

Las principales hipótesis planteadas proponen que los endófitos son mutualistas inducibles, situación diferente al mutualismo constitutivo brindado por los endófitos fúngicos en gramíneas (Carroll, 1988, 1991). La forma en que operaría el mutualismo inducible, sería mediante la producción y acción de toxinas. Los hongos, en general y los endófitos en particular, son capaces de producir un gran número de sustancias metabólicamente activas, entre ellas numerosas sustancias insecticidas. En su

hospedero, los endófitos pueden disminuir la actividad de los insectos y así bajar la densidad de las poblaciones. Por esta razón es de suponer que constituyen defensas de rápida evolución dentro del hospedero y que constituyen, junto a los compuestos químicos de la propia planta, su principal mecanismo defensivo. Los endófitos también tomarían parte en mediar las interacciones planta-insecto y este antagonismo sería específico para cada situación y bajo determinadas condiciones (Wilson, 2000).

Debido a esta actividad mutualista, se supone que los endófitos poseen ciertas ventajas selectivas para proteger a su hospedero. Los endófitos se benefician de las condiciones físicas de su hospedero en cuanto a hábitat y nutrición. Cuando se reducen las condiciones de su hospedero, por ejemplo cuando son atacados por insectos, se reducen los beneficios para el endófito. Entonces, debería existir una ventaja selectiva para que los endófitos protejan a su hospedero y este se beneficie al albergar a esos endófitos. Para que estas conclusiones sean válidas, debería darse al menos alguna de las condiciones sugeridas por Wilson (2000): a) los endófitos son directamente afectados por la herbivoría, y/o b) la herbivoría afecta negativamente al hospedero, y este influye negativamente sobre los endófitos.

Si los efectos directos o indirectos de la herbivoría sobre el hospedero tienen un impacto neutral sobre los endófitos, entonces no existe selección en el sentido de la función defensiva de los endófitos. Es posible, sin embargo, que la acción antagonista no haya surgido como resultado de los procesos evolutivos de selección contra los hongos, que no proveerían de defensas sino que simplemente los endófitos tendrían la posibilidad de producir sustancias tóxicas para los insectos (Wilson, 2000).

La mayor parte de los estudios realizados para examinar, cómo los endófitos afectan la herbivoría, hacen referencia a la influencia sobre la mortalidad de insectos y a la correlación de ambos. La mayoría de estos estudios indican que la presencia de ambos está correlacionada positivamente, otros que existe una ausencia de correlación y por último un menor número de estudios indican una correlación negativa (Wilson, 2000).

La forma en que la herbivoría afecta directamente a los endófitos ha sido estudiada en hojas dañadas natural o artificialmente (Wilson, 2000). Hojas dañadas de *Quercus emoryi* son colonizadas por un mayor número de especies en las heridas que

en otras partes, pero la especie dominante resulta menos abundante en las partes dañadas que en las sanas. Este daño parece inhibir la infección en las partes sanas de hojas dañadas con respecto a las hojas sanas testigo. Así, de hojas dañadas por lepidópteros solo un 17% de *Asteromella* sp. y 0% de *Ophiognomonina cryptica* sobrevivieron el pasaje a través del tracto digestivo de éstos insectos. Estos resultados indican efectos negativos y positivos de la herbivoría sobre la colonización por endófitos. *O. cryptica* fue afectada negativamente, mientras que otras especies fueron afectadas en diferente forma. Así, los insectos tienen efectos opuestos sobre las diferentes especies de endófitos (Wilson, 2000).

Aunque algunos estudios indican un fuerte antagonismo contra insectos, que expresaría un mutualismo defensivo, es difícil señalar si se trata de una relación mutualística o una coincidencia en que el hongo proporcione ese antagonismo (Faeth y Hammon, 1997a, 1997b).

El antagonismo ejercido hacia los insectos puede ser, principalmente, mediante la producción por parte del endófito de determinada toxina o por la acción sinérgica de varias toxinas producidas por diferentes especies de hongos o diferentes individuos de una misma especie (Carroll, 1988). Estas toxinas pueden ser activas contra insectos móviles o sedentarios y han sido obtenidas de diferentes hospederos y bajo diferentes formas. Por ejemplo, algunos endófitos de acículas de coníferas producen potentes toxinas en fermentación líquida (Clay et al., 1989). Por otro lado, Claydon et al. (1985) encontraron que *Phomopsis oblonga* (Desm.) v. Hoehnel producía sustancias que inhibían el ataque por escarabajos de la corteza del olmo. Aunque suponer que se produce una gran cantidad de toxinas por estos endófitos, como ocurre con aquéllos de gramíneas, es excesivo ya que solo en un caso se demostró la muerte de insectos de agallas por acción directa de las toxinas (Wilson, 2000).

Wilson y Carroll (1997) propusieron que si bien los endófitos pueden tener actividad antagónica sobre insectos, éstos últimos pueden evitar dicho antagonismo espacial o temporalmente, o bien escapando a hospederos con alta colonización por endófitos, de manera similar a como evitan a sus predadores. Para evitar los hospederos con altos niveles de endófitos, los insectos deben (a) detectar los endófitos y evitarlos trasladando sus sitios de oviposición o alimentación, o (b) adaptarse a

ambientes libres de endófitos. En este último caso, el nivel de endófitos debe ser lo suficientemente bajo como para permitir la sobrevivencia del insecto, en el caso de que éste no posea mecanismos de detección. Los espacios colonizados por un endófito pueden ser altamente predecibles a diferentes escalas, y de esta forma, los insectos ocupan estos espacios (Wilson, 2000). Wilson y Carroll (1997) encontraron que una especie de avispa de agallas era capaz de ocupar los espacios libres de endófitos dentro de una hoja. En el mismo trabajo, demostraron la capacidad de predecir la distribución de endófitos dentro de hojas pero no entre hojas.

En otro trabajo, Wilson y Faeth (2001) encontraron que la densidad de endófitos era predecible e inversamente proporcional al tamaño de la hoja. A su vez, el tamaño de la hoja está correlacionado con la posición en el árbol, de manera que los insectos pueden evitar las hojas con alta densidad de endófitos al escoger las hojas más grandes para alimentarse. Así, se encontró que un insecto minador (*Cameraria* sp.) de hojas de roble (*Quercus emoryi*) tenía mayor densidad de individuos en las hojas grandes, o en el interior de la canopia, donde las hojas son mayores que en el exterior (Bultman y Faeth, 1986). En general, los insectos minadores de hojas poseen una mortalidad dependiente de la abscisión prematura de hojas (Stiling y Simberloff, 1989), que es causada por los hongos endófitos (Wilson, 2000). *Cameraria* sp. fue más abundante en hojas grandes en el interior de los árboles, donde la abscisión prematura es menor, que en las hojas pequeñas del exterior donde la densidad de endófitos es mayor, y por lo tanto, es mayor la probabilidad de abscisión prematura de éstas. De esta forma, *Cameraria* sp. es capaz de evitar los espacios con altos niveles de infección con hongos endófitos y de esta forma es menos susceptible a la mortalidad asociada a la abscisión prematura de hojas. Otra posibilidad es que los insectos seleccionen las hojas más jóvenes con tejidos más fáciles de preñar.

Insectos y endófitos interactúan en diferentes aspectos. Los hongos endófitos proveen de mecanismos causales que explican ciertos aspectos de la interacción, como la abscisión de hojas con minadores, o la distribución inesperada de insectos en un determinado hospedero.

### 2.3.2 Senescencia y abscisión de hojas

Así como los efectos que los hongos endófitos causan sobre los insectos han sido poco estudiados, el rol que los endófitos cumplen en la fisiología, fenología y bioquímica de su hospedero ha recibido aún menos atención. El hecho de que los hongos endófitos causen abscisión prematura de hojas dependiente de la densidad de insectos, es indicativo de un rol mucho más amplio de éstos en la fisiología de su hospedero (Wilson, 2000).

Fisher et al. (1986) fueron los primeros en suponer cómo la presencia de endófitos en tejidos sanos pueden influir sobre la senescencia y el ciclo de vida de una planta. Esta posibilidad fue retomada por Wilson (1993) cuando encontró que discos de hojas de roble blanco libres de endófitos y con esterilización superficial, permanecieron intactas por 18 meses en placas de Petri con PDA (papa-dextrosa-agar) en ambiente fresco. Aquellos discos de hojas con endófitos se oscurecieron y fueron descompuestos rápidamente. Otras evidencias han reafirmado esta teoría, por ejemplo, Bashan (1994) encontró que *Alternaria* spp., causan infecciones endofíticas en hojas de algodón y que inoculaciones con altas concentraciones de conidios de *A. macrospora* causan abscisión prematura de hojas, caso contrario a las inoculaciones con concentraciones bajas. En el caso de inoculaciones con baja concentración de conidios, la adición posterior de conidios de *A. alternata* aceleraba la abscisión, indicativo de un efecto sinérgico entre especies. En otro caso, hojas sanas de soja mostraban una abscisión más lenta cuando eran tratadas con fungicidas que eliminaban los endófitos (Sinclair y Cerkauskas, 1996).

Faeth y Hammon (1997b) estudiaron los patrones estacionales de infección por hongos endófitos en *Quercus emoryi*. Las hojas de este roble caen en su mayoría en abril, en el Hemisferio Norte, cuando crecen las nuevas, pero algunas permanecen hasta 7 meses más en el árbol. Encontraron que la frecuencia de infección por *Ophiognomonina cryptica* aumenta de diciembre hasta abril, pero las frecuencias de infección fueron menores en las hojas que permanecían en el árbol, que en aquéllas que cayeron. Esto sugiere que *O. cryptica* influye sobre la fenología y abscisión de

hojas en este árbol. Es el nivel de infección por endófitos, y no la edad de las hojas, la que está correlacionada con el nivel de abscisión.

Según Wilson (2000), es generalizado el hecho de que los hongos endófitos alteran la fisiología de las plantas, la mayoría de los estudios sobre ecología de plantas, deberían basarse en estudios más pormenorizados de la relación coevolutiva entre planta y hongo.

### 2.3.3 Inducción de cambios químicos en la planta

Los cambios inducidos en plantas son generalmente a nivel bioquímico y en respuesta a estímulos externos que pueden afectar a las plantas a nivel fisiológico, morfológico y fenológico (Karban y Myers, 1989). La infección por hongos y el daño mecánico o por herbivoría causan cambios a nivel bioquímico en las plantas y esos cambios afectarán las relaciones entre planta y microbio o planta e insecto. Estos cambios inducen, generalmente, una respuesta defensiva más intensa contra patógenos o parásito, pero en ocasiones este cambio tiene efectos negativos o neutros para las plantas (Wilson, 2000).

Matta (1971) señala el efecto provocado por hongos que colonizan determinado hospedero, al inducir ciertos cambios en la planta. Existen varios ejemplos de hongos no patógenos que inducen cambios químicos haciendo más resistente a una planta contra el ataque de patógenos. Este es el caso de una cepa mutante de *Colletotrichum magna* Hansen, endófito y no patogénico, que induce resistencia al ataque de patógenos de la misma u otra especie, por ejemplo, activando los mecanismos defensivos de plantas contra el ataque por *C. gloeosporioides* (Prusky et al., 1994). Posteriormente, se demostró que estos cambios eran inducidos a nivel bioquímico en el hospedero (Redman et al., 1999).

Freeman y Rodrigues (1993), demostraron que una mutación simple a nivel monogénico era suficiente para convertir una cepa patógena de *C. magna* en un endófito asintomático. Cuando el hospedero, una Cucurbitaceae, era infectada por la cepa mutante no se producía síntoma y la planta era resistente a la cepa salvaje patógena.

Son desconocidas la frecuencia y la intensidad con la cual los hongos endófitos causan estos cambios en sus hospederos, pero si esta es similar a la provocada por los hongos patógenos, entonces es de esperar que este fenómeno de inducción de compuestos químicamente activos sea ampliamente distribuido (Wilson, 2000). La importancia de este efecto es desconocido, principalmente debido a que en ningún trabajo se han controlado los factores vinculados a la inducción de efectos en plantas por medio de endófitos (Wilson, 1993).

Wilson y Faeth (2001) demostraron que las especies de endófitos de *Quercus emoryi* interactúan con los cambios inducidos por el daño mecánico o por insectos sufrido por su hospedero. En hojas, la presencia de determinado hongo endófito está negativamente correlacionada a niveles significativos con las demás especies. Aunque la correlación es negativa, esto sugiere que los endófitos interactúan y que esa interacción está debida mayoritariamente a los cambios inducidos en el hospedero, principalmente por el aumento en la concentración de taninos en el follaje (Faeth, 1992). Estos taninos son fungistáticos, aunque otros mecanismos, como la competencia por los sitios de infección y la producción de metabolitos fungicidas por los mismos endófitos, pueden estar involucrados (Wilson, 2000).

En un experimento, las hojas de *Q. emoryi* fueron artificialmente dañadas y la colonización por endófitos fue estudiada, a) en el sitio de la lesión, b) en una zona sana de las hojas dañadas, y c) en una hoja sana cercana a las dañadas y utilizada como control. Los resultados mostraron que los niveles de infección aumentaban en los sitios de la lesión con respecto a las partes sanas de las mismas hojas o al control. Sin embargo, el endófito especializado *O. cryptica* respondía en forma contraria y era menos abundante en los sitios lesionados, sobre todo con respecto a los hongos más generalistas (Wilson, 2000). Por otra parte, los niveles de infección, principalmente por *O. cryptica*, en las partes sanas de las hojas dañadas eran menores que en las hojas sanas utilizadas como control. Entonces, el daño o el daño asociado a la infección por endófitos causaron que las partes sanas de las hojas dañadas fueran menos susceptibles a la infección por endófitos o causaron la muerte de los endófitos ya presentes. Los cambios químicos en las hojas o la producción de metabolitos fungistáticos favorecieron la baja infección en las partes sanas de las hojas dañadas.

Así, los endófitos pueden interactuar con las lesiones o lesiones acompañadas de infección por medio de la inducción de cambios a nivel bioquímico en el hospedero (Wilson, 2000).

La inducción en la producción de ciertas sustancias, como peroxidasa y fenoles, ha sido demostrada al inocular hojas de melón con *Cladosporium cucumerinum* Ell. y Arthur (Moran, 1999). La concentración de peroxidasa y fenoles en hojas inoculadas aumentó tres días después de la inoculación con *C. cucumerinum*. Las hojas infectadas fueron menos afectadas y tuvieron lesiones de menor tamaño causadas por *Colletotrichum orbiculare* (Berk. y Mont.) Arx que aquellas utilizadas como testigos sin inocular. Sin embargo, no existió diferencia en la preferencia de escarabajos y pulgones por alimentarse en hojas infectadas o las testigos (Moran, 1999). Estos resultados, contradicen la postura anterior y, al menos para algunos casos, la respuesta química de la planta inducida por hongos, traspoleable a los endófitos, no predice la reducción en la herbivoría por insectos. Otros cambios en el metabolismo estarán explicando esta respuesta.

Posteriormente, se ha demostrado que el estrés mecánico producido por el viento, puede incrementar los niveles de peroxidasa en hojas de melón pero a los nueve días de exposición (Moran, 1999). Síntomas de antracnosis causados por *C. orbiculare* fueron observadas en plantas expuestas a estrés mecánico por seis días, pero no en aquellas expuestas por nueve o doce días. En este caso, la reproducción de pulgones fue reducida sobre plantas expuestas por doce días a estrés mecánico (Moran, 1999). Estos resultados demuestran que otros factores, en este caso mecánicos, también pueden afectar la respuesta química de una planta y encubrir el efecto causado por los hongos endófitos.

Igualmente los hongos endófitos pueden inducir cambios en su hospedero por sí mismos luego de la infección y afectar las interacciones con otros endófitos, patógenos o insectos. Edwards y Wratten (1985) sugieren que son inducidas zonas con altas concentraciones de químicos alrededor de las lesiones en hojas provocadas por los insectos al alimentarse. Esto explicaría porque los insectos se alimentan en forma dispersa en las hojas. Wilson (2000) agrega que la inducción en la producción de sustancias químicas alrededor de las lesiones puede ser explicada por el aumento en

el nivel de infección por endófitos, que es facilitado en esas zonas dañadas. Esto también sugiere un efecto negativo de la infección por endófitos sobre los insectos. De la misma forma, si la infección por endófitos es inhibida en el resto de la hoja, esto sería otra prueba de porque los insectos se alimentan en forma dispersa para evitar los sitios con altos niveles de infección por endófitos, y por lo tanto, con altos niveles de sustancias químicas inducidas.

De cualquier manera, como se vio previamente, sería aplicable solo a algunas situaciones hasta que exista mayor evidencia sobre todos los factores involucrados.

#### 2.4 COLLETOTRICHUM

El género *Colletotrichum* Corda y su teleomorfo *Glomerella* von Schrenk y Spaulding, están asociados a una gran cantidad de enfermedades comúnmente llamadas antracnosis. Posee distribución mundial en un gran número de hospederos, pero siendo más importantes en enfermedades pre y pos-cosecha de cultivos tropicales o subtropicales. Su capacidad para causar infecciones quiescentes o latentes, los convierte en uno de los patógenos más importantes poscosecha. El género *Glomerella* fue descrito originalmente en 1903 con cinco especies válidas, siendo aceptada *G. cingulata* (Stonem.) Spauld y v. Schrenk como el lectotipo genérico por Von Arx (1957). De las 80 “especies” descritas en el género, 20 tienen como anamorfo especies del género *Colletotrichum*. En *Colletotrichum* han sido descritas aproximadamente 900 “especies”, que han ido reduciendo conforme se hacen más precisos los conceptos de especie en taxonomía, los conocimientos sobre las relaciones huésped parásito y los rangos de hospederos, así como por la aplicación de nuevos conocimientos y técnicas aplicables a estudios de circunscripción de especies. Un concepto válido a fines del siglo XIX y principios del XX, se refería a que si una especie de hongo era colectada sobre un huésped para el cuál no existía un registro previo de esta relación huésped parásito, entonces esta especie era formalmente descrita como nueva para la ciencia. Con el avance de los conocimientos, muchas de estas “especies” comenzaron a interpretarse en rangos subespecíficos como *variedad*, *forma* y *forma specialis*.

Debido a que *Colletotrichum* es fácilmente aislado en cultivo puro, las características culturales han sido además, una forma frecuente de estudiar las diferencias específicas, no habiendo aún una estandarización de las técnicas utilizadas para estudios taxonómicos (Sutton, 1992). De esta forma, se han citado aproximadamente 600 sinónimos solamente para *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig y Saccardo, la especie más común, polimórfica y que ha sido citada sobre el mayor número de hospederos.

Las confusiones en la interpretación taxonómica del género han llevado a una variada aceptación de especies y sinónimos en las claves existentes para la determinación de especies. Von Arx (1957) cita así 23 especies, pero posteriormente las aumenta a 25 (Von Arx, 1981). Sutton (1980) reconoce para *Colletotrichum* 22 especies, Baxter et al. (1983) reconocen 11 especies y Baxter y Van Der Westhuizen (1984) reconocen 12 especies. Existe cierta coincidencia, pero no total, en el número final de especies y los conceptos a aceptar para circunscribir determinadas especies. De éstas variadas fuentes, se deduce la existencia de aproximadamente 39 especies aceptables en la última revisión (Sutton, 1992). Esta lista total no puede reducirse, ya que para varias especies de importancia en patología no existe un concepto acabado de delimitación o reconocimiento (Sutton, 1980).

#### 2.4.1 Estrategias de infección en *Colletotrichum*

Durante la colonización de su huésped los hongos exhiben dos formas principales de nutrición. Biotrofia, en la cual el patógeno obtiene sus nutrientes de las células vivas del huésped, y necrotrofia, donde los nutrientes son obtenidos de células muertas destruidas por el hongo. Ambas estrategias nutricionales están presentes en el género *Colletotrichum*. Además, estos hongos desarrollan una serie de estructuras especializadas que incluyen tubos germinativos, apresorios, hifas intracelulares e hifas secundarias necrotróficas (Perfect et al., 1999).

Las especies de *Colletotrichum* son de las especies de hongos con mayor importancia fitopatológica, atacando un rango extremadamente amplio de plantas en diversos climas. Este patógeno ataca diversos órganos, incluyendo raíces, tallos,

hojas, flores y frutos, siendo en ocasiones altamente específico para determinado tejido u órgano. Otras especies son altamente específicas por determinada especie vegetal o cultivar. De éstas observaciones surge el concepto general de la existencia de determinadas especies de *Colletotrichum* que atacan un gran número de hospederos y de un determinado hospedero como sustrato de varias especies de *Colletotrichum* (Freeman, 2000).

*C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, son causantes de antracnosis poscosecha de mango y palta. (Prior et al., 1992). Los cultivos de frutilla pueden ser atacados por tres especies diferentes, *C. fragariae*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, todos causantes de antracnosis en frutos y otros órganos de la planta (Howard et al., 1992). Los cultivos de cítricos pueden ser afectados por cuatro enfermedades diferentes causadas por *Colletotrichum*. La caída post cuajado de frutos y antracnosis de la lima Key, ambos causados por *C. acutatum* y muerte de brotes con mancha foliar y descomposición de frutos post cosecha, causados por *C. gloeosporioides* (Brown et al. 1996, Timmer et al. 1998). Otros casos de hospederos con múltiples especies de *Colletotrichum* que causan enfermedades son café, cucurbitáceas, pimiento y tomate (Freeman et al., 1998).

Existe también el caso en que una sola especie de *Colletotrichum* es capaz de infectar y causar enfermedades en varios hospederos. Entre ellos se encuentra *C. gloeosporioides*, a pesar de que bajo éste nombre existe un aglomerado de formas relativamente diferentes, que es encontrado en variedad de frutos como almendra, palta, manzana, frutilla y cítricos (Freeman et al., 1998). *C. acutatum* fué encontrado sobre palta, frutilla, almendra, manzana, pera y cítricos (Adaskaveg y Hartin 1997, Freeman et al. 1998). Ejemplos de otras especies con rangos amplios o múltiples de hospederos incluyen *C. capsici*, *C. coccodes* y *C. dematium* (Dillard 1992, Sutton 1992).

Con el fin de revisar los hechos esenciales que permiten la patogénesis de *Colletotrichum*, se analizarán las diferentes etapas del ciclo de vida de éste patógeno, comenzando por su etapa final, la reproducción, ya que las esporas que produce constituyen la fuente de inóculo infectivo.

#### 2.4.2 Fuentes de inóculo

La mayor fuente de inóculo son las esporas asexuales, o conidios, producidos en acérvulos y las ascosporas producidas en peritecios, en este último caso de estar presente la etapa sexual (Bailey et al., 1992). La diseminación desde acérvulos jóvenes ocurre principalmente por gotas de agua, mientras que las ascosporas y conidios secos son distribuidos por el viento desde peritecios o acérvulos viejos (Nicholson y Moraes, 1980).

Estos propágulos se encuentran embebidos en un material mucilaginoso hidrofílico llamado matriz esporal, formado mayoritariamente por polisacáridos y glicoproteínas con pequeñas cantidades de enzimas (Louis et al., 1988), algunas de estas glicoproteínas son de alto peso molecular y ricas en prolina (Nicholson, 1992).

Una de las funciones de la matriz esporal es la de inhibir la germinación de las esporas mediante determinadas sustancias presentes en ella, como la gloeosporona (Perfect et al., 1999). Estas sustancias inhiben principalmente la germinación prematura de los conidios, cuando éstos se encuentran aún aglomerados en los acérvulos, y permite una eficaz dispersión del inóculo. Así, el lavado de estos inhibidores es fundamental para la germinación de los conidios de este patógeno. Otra de las funciones de esta matriz es la de mantener los conidios húmedos y viables en condiciones ambientales de sequedad, así como de protegerlos de la alta temperatura y de la radiación ultravioleta (Nicholson y Moraes 1980, Louis et al. 1988, Nicholson 1992). Además, la presencia de enzimas como la invertasa, poligalacturonasa, celulasa y pectin liasa presentes en la matriz, podrían contribuir a la provisión de nutrientes durante la germinación, penetración y posterior crecimiento dentro de los tejidos vegetales (Louis y Cooke, 1985). Sin embargo, este mucílago parece no tener ninguna función en la adhesión de esporas y ninguna glicoproteína adhesiva ha sido clonada de ninguna especie de *Colletotrichum* (Perfect et al., 1999).

### 2.4.3 Adhesión de propágulos sobre la superficie vegetal

El primer paso durante el proceso de patogénesis es la adhesión de los propágulos dispersados sobre la superficie vegetal. Las estrategias de adhesión de esporas de *Colletotrichum* sobre su hospedero son esencialmente las mismas para todas las especies estudiadas (O`Connell et al., 2000).

Las esporas de *Colletotrichum* se adhieren de una manera no específica a diferentes superficies mediante el mucílago que las recubre, pero la adhesión es mayor cuando existe un reconocimiento del hospedero. Así la germinación de conidios se reduce en un 80%, en hojas de hospederos específicos en los que se removió la cera protectora (Young y Kauss, 1984). Sin embargo no existen estudios completos sobre la importancia de esta cera en la inducción y germinación de propágulos de *Colletotrichum*, tampoco sobre la liberación de sustancias adhesivas específicas por parte del conidio como se demostró para *Magnaporthe grisea* (Hamer et al., 1988). La germinación *in vitro* de conidios es generalmente muy baja debida al efecto de los inhibidores, como la gleosporona en *C. gloeosporioides* (Bailey et al., 1992). Otras especies, por ejemplo *C. graminicola*, producen micosporina durante la germinación de conidios que tendría una función similar (Leite et al., 1992). Sobre frutos de mango, la aplicación de suspensiones con una concentración de  $10^6$  conidios de *C. gloeosporioides* por ml provoca un descenso en su germinación de hasta un 0%, la cual aumenta a un 100% de germinación cuando son aplicadas concentraciones de  $10^5$  conidios/ml. La adición de ciertos nutrientes, provistos en extractos de frutos, parece complementar las condiciones para el aumento en los porcentajes de germinación (Kuo, 1999).

La adhesión de conidios de *Colletotrichum* a la cutícula del hospedero en un principio involucra interacciones hidrofóbicas, como ocurre para la mayoría de los hongos patógenos de plantas (Perfect et al., 1999).

Los conidios de *Colletotrichum* poseen en su superficie una capa externa de fibras ordenadas en forma perpendicular a la pared celular (Van Dyke et al., 1991). Esta capa externa o cubierta esporal, solo puede ser visualizada al microscopio electrónico de transmisión mediante técnicas que permiten conservar el mucílago que

la recubre (O`Connell et al., 2000). La cobertura posee una estructura esponjosa o porosa similar a las cubiertas superficiales de mannoпротеínas de otros hongos. En *C. lindemuthianum* la cubierta también aparece compuesta por glicoproteínas, como se ha probado al ser completamente removida por enzimas proteolíticas y reaccionar con reactivos específicos para carbohidratos. Esta capa carece de quitina y beta-1,3-glucano, los principales polisacáridos que componen las paredes celulares en hongos (Perfect et al. 1999, O`Connell et al. 2000).

En algunas especies como *C. musae*, la adhesión es inhibida por la aplicación de enzimas proteolíticas lo que sugiere que para esta especie son necesarias proteínas preformadas, al menos para la adhesión inicial (Perfect et al., 1999).

Un metabolismo activo, incluida la síntesis proteica, están asociados a una segunda fase de adhesión que consolida la primera fase hidrofóbica (Young et al., 1984). Esta segunda fase de adhesión va acompañada en algunas especies con una eliminación de exudados de proteína que se extiende desde el conidio como una película sobre el substrato, en otras especies, como *C. lindemuthianum*, esto no ocurre (Perfect et al., 1999). En esta especie no existe evidencia de la liberación de sustancias previa a la emergencia del tubo germinal, lo que sugiere que no posee ninguna molécula adhesiva preformada en la superficie del conidio (Perfect et al., 1999).

La adhesión del tubo germinativo y los apresorios a la superficie vegetal es generalmente más fuerte que la de esporas. La adhesión de apresorios es particularmente más fuerte para permitir una base para la posterior penetración de la superficie vegetal. Esto se evidencia al permanecer fragmentos de la pared del apresorio adheridas a la superficie luego de sucesivos lavados (Perfect et al., 1999). Fimbrias de hasta 6 $\mu$ m de largo se encuentran presentes en la superficie de apresorios y tubos germinativos de varias especies de *Colletotrichum*, y se supone que componentes de la matriz secretados por estas células son responsables de la adhesión (Perfect et al., 1999). Al igual que para las esporas, fueron identificadas glicoproteínas de alto peso molecular como responsables de la adhesión de apresorios y tubos germinativos. La evidencia sugiere que algunas de esas glicoproteínas se vuelven insolubles luego de la secreción, posiblemente debido al ligamiento con otras

sustancias de la pared o la matriz o por polimerización (Perfect et al., 1999). Sugui et al. (1998) encontraron, mediante la aplicación de lectinas a la matriz extracelular de *C. graminicola*, una glicoproteína de más de 200 kDa como responsable de esta adhesión.

#### 2.4.4 Diferenciación de estructuras sobre la superficie vegetal

Luego de adherirse a la superficie vegetal, los conidios o ascosporas germinan desarrollando un complejo mecanismo de diferenciación para formar apresorios, estructuras esenciales para la infección en la mayoría de las especies de *Colletotrichum* (O`Connell et al., 2000).

Durante la germinación se forma un septo en el conidio de la mayoría de las especies de *Colletotrichum*, seguido de mitosis. La formación de apresorios comienza cuando el crecimiento apical del tubo germinativo del conidio cesa y el ápice es delimitado por un septo. Los apresorios pueden ser sésiles formándose al final del tubo germinativo u ocasionalmente al extremo de ramificaciones hifales. La maduración del apresorio involucra la formación de un poro de penetración en la base de la célula, la deposición de nuevas capas en la pared y secreción de materiales de la matriz extracelular. Posteriormente es depositada melanina en una de las capas de la pared celular cercana a la membrana plasmática (Bailey et al., 1992).

En la mayoría de las especies no es formado un cono por el apresorio, pero la pared celular forma un grueso anillo alrededor del poro de penetración (Perfect et al., 1999).

La señal recibida por el patógeno para germinar y diferenciarse está dada por el etileno, que posee función hormonal para la maduración de frutos (Flaishmen et al., 1994). En el caso de *C. gloeosporioides*, la secreción de la matriz extracelular desde el conidio ocurre momentos previos a la germinación. La superficie ocupada por esta matriz llega a ser varias veces mayor al ancho del conidio (Kuo, 1999). Esta matriz, al menos para *C. graminicola*, está compuesta de carbohidratos (Lapp et al., 1978), sin embargo ha sido reportado que la composición de esta matriz en las royas es principalmente por proteínas (Epstein et al., 1985).

Los componentes de la cera de la superficie del hospedero también son capaces de inducir la germinación y diferenciación de apresorios, al menos en *C. gloeosporioides*. La señal de la cera es específica ya que las ceras de otros substratos no sustituyen la señal dada por el propio hospedero (Podilia et al. 1993, Perfect et al. 1999). Estos apresorios pueden formarse en ausencia del hospedero, por ejemplo en superficies rígidas como laminillas de vidrio o membranas de nitrocelulosa luego de exponerlas a concentraciones micromolares de etileno (Mendgen et al., 1996).

Los apresorios son característicos del género *Colletotrichum* aunque poseen diferentes formas y tamaños según la especie. La pared de los apresorios posee estructuralmente dos a tres capas, una de ellas melanizada preferencialmente. Durante la penetración de las superficies vegetales los apresorios de *C. gloeosporioides* forman poros germinales en sus paredes rodeados por un cono apresorial que es una extensión de la pared de la hifa de diferenciación y actúa ejerciendo presión hidrostática en el sitio de penetración. En otras especies estos conos no se forman, evidenciando la existencia de variadas formas de penetración al hospedero dentro del género *Colletotrichum*.

Existen pocos datos que pongan en evidencia la penetración indirecta a través de estomas o heridas sin la utilización de apresorios (Morin et al., 1996).

En contraste con los pocos datos sobre adhesión de esporas a las superficies vegetales, existen ejemplos sobre la firme adhesión ejercida por los apresorios, tanto sobre las superficies vegetales como sobre otras superficies. A pesar de ello, no se ha llegado a especificar cuando comienza el proceso de adhesión durante la diferenciación. La adhesión de los apresorios brinda un contacto íntimo del patógeno con su hospedero durante el tiempo necesario para que ocurra la penetración de la superficie y además permite la ubicación de la hifa de infección en el sitio a penetrar mecánica o enzimáticamente. La formación de los apresorios es acompañada de una secreción de mucílago y materiales adhesivos que lo recubren. No se conoce si este mucílago brinda la adhesión o este es un proceso diferente. Este mucílago protege a los apresorios de temperaturas extremas o de la desecación. Se sugiere que este mucílago está compuesto de polisacáridos complejos, como la hemicelulosa, dada la capacidad de remoción de apresorios mediante hidróxido de sodio (Lapp et al., 1978).

La diferenciación de apresorios requiere de síntesis proteica y es acompañada de una precisa regulación del estado nuclear. En algunas especies la mitosis precede la formación de un septo en el conidio. Uno de los núcleos se traslada posteriormente a través del tubo germinal donde sufre una segunda mitosis y se forma un segundo septo, pero solo un núcleo está presente en la célula que dará el apresorio. Durante la maduración, otra mitosis producirá un apresorio maduro binucleado. Cuando ocurre la infección, un núcleo se traslada con el *peg* de infección hacia el tejido infectado y el otro núcleo permanece en el apresorio. El crecimiento posterior de la hifa infectiva producirá un micelio multinucleado típico (Bailey et al., 1992).

Uno de los productos que requieren de síntesis proteica es la melanina. Ésta da a los apresorios su típico color oscuro que lo protege de la radiación y posee funciones cruciales en el proceso de infección (Dean, 1997).

La melanina tiene una importante función en el mantenimiento de la presión hidrostática necesaria para la penetración de la cutícula, ya sea por el mantenimiento de solutos dentro del apresorio, que causan absorción de agua por ósmosis, o por proveer de mayor rigidez a la pared del apresorio. Además la melanina presente en los apresorios disminuye la permeabilidad de la membrana facilitando la acumulación de osmolitos y la generación de turgor dentro de la célula (Henson et al., 1999). Sin la suficiente presión de turgor, se ha demostrado que el *peg* de infección no puede penetrar mecánicamente el tejido del hospedero (De Jong et al., 1997).

La presencia de nutrientes puede aumentar el grado de germinación de esporas, pero pequeñas cantidades pueden prevenir la formación de apresorios. Se ha demostrado que en *C. musae*, la naturaleza química de la superficie vegetal aumenta la germinación de esporas y la formación de apresorios. La utilización de macerados de banana aumentan esta germinación de esporas. La disponibilidad de hierro es otro factor que influye en la germinación. Los conidios de *C. musae* y *C. acutatum* germinan poco en medios con altos contenidos de hierro, pero germinan normalmente en medios pobres en este metal. La adición de agentes quelatantes del hierro a los medios de cultivo provocan una aceleración en la formación de apresorios y aumentan la proporción de la melanización. Como la melanización es de suma importancia en el

proceso de penetración de la superficie vegetal, los quelatos de hierro son fundamentales en el proceso de patogénesis.

La topografía de la superficie vegetal no parece tener gran influencia en estimular la formación de apresorios como se ha encontrado para otras especies de patógenos. En *C. graminicola*, la ubicación de apresorios depende solamente de las características físicas de la superficie y su distribución en las depresiones de crestas naturales o artificiales se debe fundamentalmente a la gravedad (Lapp et al., 1978).

#### 2.4.5 Penetración de la superficie vegetal

Existen muchas vías de entrada de la superficie vegetal en *Colletotrichum*, pudiendo penetrar a través de estomas o heridas, siendo la vía más común la penetración directa de la cutícula (Bailey et al., 1992).

Algunas especies penetran por heridas, pero la presencia de heridas no es condición única para permitir la infección por el patógeno. El contacto directo de micelio de *C. lindemuthianum* con heridas en hipocótilos de arvejas no es condición suficiente para la entrada y posterior colonización del tejido por parte del hongo, no produciendo síntomas típicos de antracnosis (Bailey et al., 1992).

En éste y otros casos la herida no es la vía directa de penetración. La colonización ocurre debido a que el hongo entra a través de la cutícula y el crecimiento queda restringido a la capa epidérmica. El crecimiento en los tejidos subyacentes ocurre luego de la muerte de éstos y donde el patógeno es capaz de esporular (Bailey et al., 1992). Muchas enfermedades de cultivos tropicales o subtropicales, incluyendo el de *Citrus* spp., aparecen luego de un período de latencia que posee muchas analogías con el proceso anteriormente detallado (Bailey et al., 1992). Luego de penetrar la superficie del fruto, el crecimiento de ciertas especies de *Colletotrichum* queda restringido al tejido epidérmico. Cuando ocurre la maduración del fruto, y por lo tanto las condiciones se hacen adecuadas para el desarrollo del hongo, el patógeno es capaz de causar enfermedad (Prusky, 1996).

En la mayoría de las especies de *Colletotrichum* que atacan tejidos jóvenes, la penetración directa de la cutícula es de gran importancia. La penetración de *C.*

*gloeosporioides* en varias especies de cítricos ocurre luego de la formación de apresorios, pero existen ejemplos de penetración sin la utilización de estas estructuras (Brown, 1975). Los mecanismos utilizados para este proceso son básicamente tres: a) mediante fuerzas mecánicas, b) mediante secreción de enzimas degradadoras de la cutina y c) por una combinación de las dos anteriores. Existen evidencias de que *Colletotrichum* puede ejercer fuerza suficiente como para penetrar la cutícula (Bailey et al., 1992). Mediante el estudio de micrografías electrónicas de la penetración de la cutícula, se ha concluido que las fuerzas mecánicas ejercidas son el principal componente de la penetración de la cutícula. La importancia de la penetración vía fuerzas mecánicas se observó en estudios con apresorios no melanizados, ya sean mutantes o cepas en las que se ha inhibido la síntesis de melanina. Las cepas deficientes en melanina son incapaces de penetrar membranas artificiales o cutículas (Suzuki et al., 1982). El restablecimiento de la síntesis de melanina, mediante la adición de precursores, restablece la capacidad patogénica en *Colletotrichum graminicola* (Rasmussen et al., 1989).

En forma alternativa, la penetración requiere de enzimas que ablanden o disuelvan la cutícula. Muchas especies de *Colletotrichum* son capaces de producir esterases que degradan cutina. *C. gloeosporioides*, así como *C. capsici*, son capaces de producir cutinasas al menos en cultivos líquidos (Bailey et al., 1992). Así, esta enzima se sintetizó y se estudiaron sus propiedades en detalle en el proceso de patogénesis. La determinación de la función de las cutinasas en la infección está basada en trabajos con inhibidores órgano fosforados de la cutinasa y con mutantes sin actividad cutinasa. Los mutantes de *C. gloeosporioides* deficientes en cutinasa no penetran cutículas sanas de papaya, pero cuando la superficie es dañada o tratada con cutinasas se desarrollan lesiones normales. De manera similar, no se producen lesiones cuando la superficie es inoculada con una mezcla de inhibidores de la cutinasa y conidios de este hongo (Dickman et al., 1983). En otras especies, como *C. lindemuthianum*, la penetración no se puede interrumpir con el agregado de inhibidores. Han sido aisladas dos tipos de cutinasas de cultivos de *C. lagenarium*, y se encontró que la inhibición de estas cutinasas no afecta la patogenicidad. Por otra parte, la diferencia en la producción de estas enzimas, no está correlacionada con la

patogenicidad. La evidencia indica que, en algunas especies de *Colletotrichum*, se requiere la actividad cutinasa para la penetración, mientras que en otras predominan las fuerzas mecánicas.

El próximo paso en el proceso de infección por *Colletotrichum* es la penetración de la pared celular de la epidermis periclinal. *Colletotrichum* es capaz de crecer a través de esa pared celular como consecuencia de la secreción y actividad de enzimas degradadoras de la pared. El mecanismo por el cual este patógeno penetra al hospedero determina su posterior desarrollo (Bailey et al., 1992).

#### 2.4.6 Patógenos intramurales subcuticulares

Durante los primeros estadios de infección, algunas especies de *Colletotrichum* son capaces de crecer a través de la cutícula y entre las paredes periclinales. En general no penetran el lumen de las células epidérmicas. Las primeras descripciones sobre la penetración de hifas a través de la cutícula muestran que no llegan a degradar mucho la pared celular. Estudios posteriores han mostrado una importante descomposición de esa pared (Bailey et al., 1992). Por ejemplo *C. capsici*, un patógeno de pimiento, es capaz de atravesar preferentemente las células accesorias de los estomas, pero nunca directamente a través de la abertura estomática (Roberts et al., 1984). Luego de penetrar la cutícula, las hifas crecen en la pared causando una disolución parcial de su estructura. El proceso posterior es la producción de apresorios, el *peg* de infección atraviesa la cutícula e inmediatamente se disuelve la pared de las células periclinales adyacentes. Posteriormente, el crecimiento hifal causa una degradación de la pectina, mientras que las fibras de celulosa permanecen intactas. En las 24 horas posteriores a la penetración no se observa infección. Igual que en los hemibiótrofos intracelulares, las primeras etapas de infección tienen lugar en ausencia total de síntomas. El crecimiento posterior de las hifas es dentro de las paredes anticlinales de la epidermis y dentro de la pared de las células corticales. En las 48 horas siguientes se produce una red intramural de hifas a través del tejido. Al igual que en la penetración de hemibiótrofos intramurales, no se observa ninguna reacción de resistencia al patógeno. Es significativo el hecho de que las especies de *Colletotrichum*

que actúan por hemibiotrofia, lo cual incluye una íntima relación citoplasmática entre el patógeno y la planta, exhiban una alta especificidad por el hospedero, excepto *C. capsici* que crece en las paredes celulares de un amplio rango de hospederos.

En los estudios realizados sobre los mecanismos de penetración parece quedar en claro que la infección inicial ocurre solamente mediante dos estrategias, hemibiotrofia intracelular y crecimiento intramural. Si bien estas estrategias son las utilizadas por la mayoría de las especies de *Colletotrichum*, la distinción es poco clara en algunas de estas relaciones que parecen exhibir ambos tipos de estrategia, como se ha observado en *Stylosanthes* spp. (Fabaceae) infectada por *C. gloeosporioides* donde aparecen ambas estrategias de penetración sobre el mismo tejido (Trevorrow et al., 1988). *C. trifolii*, si bien guarda similitudes con otras especies, no posee una fase biotrófica inicial de infección (Bailey et al., 1992).

#### 2.4.7 Desarrollo necrotrófico y reproducción

Ocurrido el proceso de colonización por cualquiera de los procesos explicados anteriormente, el patógeno continúa un desarrollo necrotrófico. La fase necrotrófica es la causante de los síntomas típicos de antracnosis. Esta fase está asociada principalmente a un incremento de la expresión de enzimas que degradan la pared celular, como endo-poligalacturonasas y pectin-liasas. La evidencia apunta a que estas enzimas que degradan las pectinas de la pared celular juegan un papel preponderante en el desarrollo necrotrófico y en la posterior aparición de síntomas (Perfect et al., 1999).

Durante esta etapa, el patógeno crece profusamente a través de los tejidos del hospedero, dentro de las células, a través de las paredes celulares y en los espacios intercelulares. A pesar de ocurrir una intensa destrucción de tejidos, las cutículas de los tejidos dañados permanecen intactas. Esto sugiere que si bien existen cutinasas involucradas en la penetración inicial de la superficie vegetal, su síntesis o actividad se inhibe en etapas posteriores.

Las cutículas intactas pueden cumplir varias funciones junto a la de mantener al patógeno dentro de los tejidos. Pero aun más importante es su posible función en la

reproducción de *Colletotrichum*. La producción de acérvulos y peritecios requiere de una cutícula intacta. Estudios sobre la formación de acérvulos revelan la existencia de dos tipos de estas estructuras, y ambas requieren de la formación de un estroma hifal debajo de la cutícula. Los estromas pulvinados son los más comunes, se forman a través de las células de la epidermis y dependen de fuerzas mecánicas para romper la pared de la epidermis y llegar a la cutícula. Los acérvulos hipoestromáticos son formados cuando las setas y conidióforos producen perforaciones individuales en la epidermis y cutícula. Esta última característica está difundida mayoritariamente en las especies cuyos hospederos son gramíneas, como *C. graminicola*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MUESTREO

El muestreo fue realizado el 27 de julio del 2000 en un predio de la Empresa “Milagro S.A.” cercano a la ciudad de Young, Departamento de Río Negro. Se eligió un cuadro en producción comercial de 3 ha de naranjo [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] var. “Washington navel” sin podar, con riego por goteo, injertado sobre pie de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf al cual solo se le había aplicado cobre en el mes de junio.

Se eligieron para muestrear 20 árboles al azar, tomando un par por fila y en filas alternas. De cada uno de los árboles se muestrearon 5 ramas del año, cortándose de diferentes posiciones y altura con una tijera de podar. Se eligieron ramas con hojas completamente desarrolladas y que no presentaban síntomas de ninguna enfermedad o daños causados por patógenos o plagas.

Así, se obtuvieron en total 100 ramas asintomáticas que fueron guardadas individualmente en bolsas de polietileno, etiquetadas y transportadas al laboratorio en cámara fría. En el laboratorio las muestras fueron mantenidas en heladera a 5 °C hasta ser procesadas. Todos los materiales fueron procesados para el tratamiento en las siguientes 48 horas después del muestreo.

#### 3.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El total de las ramas obtenidas fue tratado como una muestra compuesta para obtener los fragmentos de órganos a partir de los cuales aislar los hongos endófitos.

Para el aislamiento de los endófitos presentes en hoja se escogieron 100 hojas, una de cada rama, completamente desarrolladas y sin ningún daño o síntoma. De cada hoja se obtuvieron, con un sacabocados de 5 mm de diámetro, cinco discos de tejido, tres de las zonas basal, central y distal del nervio central y dos de la lámina, uno a cada lado del nervio central. Los pecíolos de cada una de las hojas tratadas fueron seccionados en dos fragmentos de aproximadamente 4 mm de largo, un fragmento de la base alada y otro adyacente a la lámina.

Para obtener fragmentos de las ramas, se cortaron con tijera segmentos de hasta 6 mm de diámetro y de unos 5 cm de largo sin daños o síntomas visibles en corteza o madera. Las hojas y yemas fueron eliminadas de estos fragmentos. Los fragmentos de ramas fueron trozados en discos de 5 mm de largo con un bisturí y separados según pertenecieran al entre nudo (ubicados entre las yemas) o nudos (posición de las yemas). Estos discos fueron trozados con un bisturí en cuatro partes de tamaño similar y a los fragmentos provenientes del entre nudo se les separó la médula de la corteza. Cada uno de los materiales, corteza o médula del entre nudo, fue tratado por separado.

Los pedúnculos de frutos fueron cortados de las ramas e inmediatamente separados el cáliz del pedúnculo. Cada cáliz se trozó con un bisturí en cuatro fragmentos de similar tamaño y así fueron tratados. Del pedúnculo de frutos se cortaron con bisturí discos de 5 mm de largo. A estos discos del pedúnculo se los trozó en cuatro fragmentos de similar tamaño y se separó la médula de la corteza. Cada uno de éstos, médula o corteza, fue tratado por separado.

### 3.3 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

En total se obtuvieron 500 fragmentos de hoja, 200 de pecíolo, 100 de cáliz, 100 de corteza de pedúnculo de fruto, 100 de médula de pedúnculo de fruto, 200 de nodo, 200 de corteza de entre nodo y 200 de médula de entre nodo (TABLA 1).

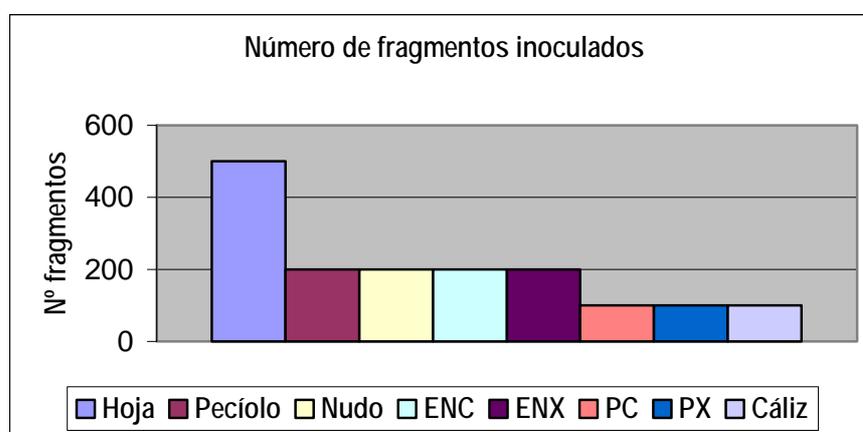
Los 1600 fragmentos fueron esterilizados por el mismo método y por separado según la parte del órgano del que provenían.

Se realizó una esterilización superficial de cada segmento, de la siguiente manera: se sumergieron por 30 segundos en etanol al 70%, posteriormente se filtraron y sumergieron por 2 minutos en hipoclorito de sodio al 4% y por último 15 segundos en etanol 70%. Luego de la esterilización, los fragmentos fueron filtrados y se lavaron con agua destilada estéril 3 veces.

El medio de cultivo fue preparado, según etiqueta, al disolver 49 gramos de agar papa dextosada Difco (PDA) en 1000 mililitros de agua destilada. El medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 18 minutos. Luego de esterilizado, el medio

se dejó enfriar a aproximadamente 40 °C y se adicionó cloranfenicol a razón de 100 mg por litro de medio para evitar la contaminación por bacterias (Schulz et al., 1993). Se volcó aproximadamente 20 mililitros de medio PDA en placas de Petri de plástico estériles de 9 cm de diámetro y se dejaron solidificar.

**TABLA 1:** Número de fragmentos inoculados según parte de tejido.



Abreviaciones: ENC = corteza de entre nudo; ENX = xilema de entre nudo; PC = corteza de pedúnculo; PX = xilema de pedúnculo.

Los fragmentos fueron sembrados al colocarse 10 fragmentos, separados según parte del órgano al que pertenecían, por placa de Petri dentro de una cámara de flujo laminar. Para verificar la eficacia del método de esterilización superficial se realizaron siembras en blanco (Schulz et al., 1993). Para ello, a una placa excedente de cada parte de órgano se le retiraron los fragmentos 5 minutos después de la inoculación y posteriormente fueron incubadas como las demás. Las placas de Petri luego de sembradas fueron llevadas a incubadora a 25 °C con alternancia luz/oscuridad de 12 horas. Se controlaron a diario hasta la aparición de colonias, las que fueron contadas y aisladas según morfología para su posterior determinación. Las colonias así obtenidas en cultivo puro fueron determinadas, en lo posible hasta especie, siguiendo las claves de Sutton (1980, 1992). Aquellos aislamientos de micelio vegetativo que permanecieron incambiados y no esporularon al cabo de 6 semanas

fueron clasificados según morfología y color de la colonia. Para aquellos aislamientos cuyas características culturales fueran similares a las del género *Colletotrichum* se procedió a un estudio en profundidad.

### 3.4 EL GÉNERO *COLLETOTRICHUM*

Dentro de éste, se obtuvieron una variedad de formas a las cuales, en un principio, era imposible asignar a las especies comúnmente aceptadas dentro del género. Dentro de estos grupos morfológicos la mayor diversidad de formas eran asignables en sus caracteres microscópicos a *C. gloeosporioides*. De esta forma, los grupos morfológicos (GM) asignables al género *Colletotrichum* fueron sometidos a un estudio taxonómico más completo. En el CUADRO 1 se describen las principales características de las colonias utilizadas para individualizar los diferentes aislamientos pertenecientes a *Colletotrichum* spp.

Para cada uno de los GM reconocidos se escogió por lo menos una cepa proveniente de cada parte de órgano de la que fueron aisladas. Del GM2, el más abundante, se utilizaron varias cepas de forma de conocer su variación en forma más completa. Los aislamientos se hicieron crecer en placas de Petri conteniendo PDA por dos semanas o más hasta la aparición de esporodocios, fácilmente reconocibles por el color anaranjado a salmón que toman al liberar las masas de conidios. De esta masa de conidios se tomó, con un anza estéril, una reducida biomasa de conidios y luego se punzó sobre medio de PDA en placas de Petri, de forma de obtener cultivos cuasi monospóricos. Los cultivos obtenidos se transfirieron a placas de 9 cm de diámetro conteniendo PDA y se hicieron crecer durante una semana a 24°C y a oscuridad permanente. Estas colonias se utilizaron para los siguientes ensayos.

*Diámetro de crecimiento:* Del borde de las colonias obtenidas se extrajeron discos de 5 mm de diámetro que se inocularon al centro de placas con PDA, incubándose a 24 °C y oscuridad permanente durante una semana. De cada una de las placas se midió el diámetro de la colonia, tomándose dos medidas perpendiculares cada 48 horas. Se realizaron tres réplicas para cada cepa y se repitió el experimento.

*Descripción macromorfológica:* De igual forma, se inocularon placas de PDA que fueron incubadas a 24 °C por dos semanas y con alternancia luz/oscuridad de 12 horas. A las dos semanas se describió la macroscopía de la colonia: morfología, textura y color del micelio aéreo y sumergido, coloración del medio y aparición de estructuras macroscópicas como esclerocios, aglomerados de micelio y zonación. Se realizaron cinco réplicas.

*Tamaño y forma de estructuras microscópicas:* Luego de la descripción macromorfológica, las placas fueron utilizadas para hacer preparados microscópicos. Se midió largo y ancho de al menos 25 conidios de cada cepa y se clasificó según morfología de éste (cilíndrico, ovoide, fusoide). Se observó el color, forma y tamaño de las estructuras microscópicas presentes, como clamidosporas, apresorios y setas, de éstas últimas se contaron además el número de septos.

### 3.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó la frecuencia relativa en que fueron aisladas las especies como el porcentaje del número de aislamientos de una especie sobre el total de segmentos inoculados.

A los efectos de poner en evidencia diferencias de colonización de hongos entre los diferentes órganos y tejidos se llevo a cabo un análisis factorial de correspondencia simple. Los datos fueron analizados utilizando el programa Statistica (STATSOFT, 1995). En el primer caso el análisis se realizó sobre las especies con una frecuencia mayor o igual al 2%, en tanto que en el segundo caso sobre aquellas especies presentes con una frecuencia mayor o igual al 5%.

En ambos casos se incluyeron todos los aislamientos de *Colletotrichum*, independientemente de su frecuencia de aislamiento.

**CUADRO 1:** Caracteres utilizados para separar grupos morfológicos (GM) de *Colletotrichum* spp.

<b>GM1</b>	Colonia al principio gris oscuro, oscureciéndose rápidamente a castaño oscuro hasta negro. Micelio algodonoso, denso, ocasionalmente zonado. Aparecen rápidamente primordios de peritecios. Conidios cilíndricos, septados.
<b>GM2</b>	Colonia al principio blanquecina a gris claro, rápidamente gris oscuro a castaño grisáceo. Micelio algodonoso, denso, ocasionalmente con zonas de escaso micelio aéreo y con abundantes esporodoquios con exudaciones salmón anaranjado o anaranjado. Peritecios en algunas cepas. Conidios cilíndricos.
<b>GM3</b>	Colonia al principio blanca, con zona del inóculo crema a grisáceo, oscureciéndose completamente a gris claro o con zonas grises. Micelio algodonoso, poco denso o con escaso micelio aéreo. Esclerocios negros. Conidios cilíndricos elipsoidales.
<b>GM4</b>	Colonia blanco puro a blanco sucio o grisáceo. Micelio aéreo algodonoso, denso, ocasionalmente zonado, zonación en diferente tonalidad. Conidios ovoides.
<b>GM5</b>	Colonia blanca o gris claro, con zona del inóculo rosado o gris oscuro. Micelio aéreo escaso, apretado. Esclerocios negros. Conidios cilíndricos elipsoidales.
<b>GM6</b>	Colonia gris con puntuaciones gris oscuro. Micelio algodonoso o lanoso, apretado o laxo. El medio se tiñe de color anaranjado o miel. Conidios ovoides.
<b>GM7</b>	Colonia blanco puro al inicio, rápidamente gris zonado. Micelio algodonoso al principio, apretado y postrado al pigmentarse. Esclerocios negros. Conidios cilíndricos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 AISLAMIENTOS

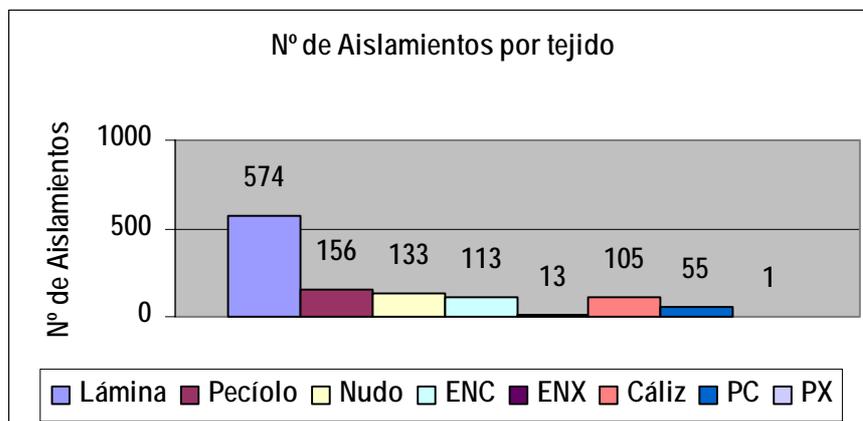
Se obtuvieron un total de 1150 aislamientos de los 1600 fragmentos vegetales analizados (500 fragmentos de hoja, 200 de pecíolo, 100 de cáliz, 100 de corteza de pedúnculo de fruto, 100 de médula de pedúnculo de fruto, 200 de nodo, 200 de corteza de entre nodo y 200 de médula de entre nodo).

De las placas utilizadas en la prueba de esterilidad no se obtuvieron aislamientos.

El número de aislamientos fue muy variable según la parte de los tejidos del que fueron obtenidos, desde 574 (en 500 fragmentos) provenientes de hojas hasta 1 aislamiento (en 100 fragmentos) de la médula del pedúnculo (CUADRO 2, TABLA 2). Solo los fragmentos de hoja y cáliz presentaban un número de aislamientos mayor que el de fragmentos incubados (574 y 105, en 500 y 100 fragmentos respectivamente). El total de taxa obtenidos fue de 31, incluidos 4 micelios estériles. Se obtuvieron entre 1 y 2 aislamientos por segmento.

Los aislamientos se identificaron a nivel de especie, en la medida de lo posible, para algunos géneros, como *Alternaria* Nees: Fr., *Cladosporium* Link: Fr. y *Phoma* Sacc. Algunos aislamientos con baja frecuencia de aparición pertenecientes a estos géneros fueron tratados como conjunto de especies.

Por el contrario, aquellos aislamientos pertenecientes al género *Colletotrichum* se trataron por separado en un estudio taxonómico más completo debido a su importancia y frecuencia de aparición. Algunos aislamientos pertenecientes al género *Colletotrichum* produjeron la fase sexual (*Glomerella cingulata*) durante el presente estudio. Es de suponer que tanto las cepas auto-fértiles como las auto-estériles, en el caso de haber cruzamiento, produjeron dicho estado. Sin embargo, debido a que dicho estado no fue inducido y no fueron individualizadas, el total de las cepas fue sumado en la tabla a su correspondiente anamorfo, en todos los casos *Colletotrichum* GM2.

**TABLA 2:** Número de aislamientos obtenidos por partes de tejido.

Abreviaciones: ENC = corteza de entre nudo; ENX = xilema de entre nudo; PC = corteza de pedúnculo de fruto; PX = xilema de pedúnculo de fruto.

#### 4.2 AISLAMIENTOS DE PARTES DE ÓRGANOS

Las partes de órganos que presentaban un mayor número de especies fueron lámina con 15, y cáliz y nodo con 14 taxa. Sin embargo, el pecíolo, corteza de pedúnculo y corteza de entrenodo, fueron similares habiéndose encontrado en todos 12 taxa. Los segmentos con menor número de especies fueron xilema del entre nudo y xilema del pedúnculo con 3 y 1 taxa respectivamente (CUADRO 2).

De los 31 taxa obtenidos, 20 se encontraron con una frecuencia relativa mayor o igual al 2%. Los taxa con una frecuencia relativa mayor al 2% fueron: 8 en la corteza de pedúnculo, 7 en el cáliz, 6 en el pecíolo, 5 en la corteza de entre nudo y nodo, 4 en la lámina, 2 en la médula del entre nudo y 0 en médula del pedúnculo.

Ningún taxa fue compartido por las 8 partes de órganos estudiadas. Los taxa más frecuentes en cada parte de órganos fueron: *Colletotrichum* GM2 que apareció en 7 de los 8 (no se aisló de médula de pedúnculo), en 5 de ellos con frecuencia mayor al 2%; *Alternaria alternata* (Fr.) Keissel en 6 tejidos de 8 (no se aisló del xilema), en 3 de ellos con frecuencia mayor al 2% y *Glomerella septospora* Sivan. y Hsieh que se aisló de 5 de las partes de órganos, en todos con frecuencia mayor al 2%. Otros 6 taxa se

aislaron de 4 partes, 6 de 3, 7 de 2 y 9 fueron exclusivos para una sola; 2 de ellos para hoja, cáliz y corteza de pedúnculo, pero solo *Phoma exigua* Desm. con una frecuencia de 2% en corteza de pedúnculo. Un taxa fue exclusivo de nudo, pecíolo y corteza de entre nudo. Solo *Colletotrichum* GM4 (6,5%) se encontró con una frecuencia mayor al 2% en corteza de entre nudo. No se obtuvieron taxa exclusivos para médula de entre nudo y médula de pedúnculo.

#### 4.3 AISLAMIENTOS POR ÓRGANO

El número de especies encontradas fue similar para los tres órganos, 20 taxa en pedúnculo de fruto, 19 taxa en hoja y 18 taxa en rama (CUADRO 3).

Al analizar las frecuencias por órgano, se observó que solo 12 taxa aparecieron con una frecuencia mayor a 2% en el total de aislamientos: 4 en hoja, 5 en rama y 7 en pedúnculo de fruto.

Para los 31 taxa obtenidos, se encontró que 7 aparecieron en los tres órganos, pero de ellos solo 4 con una frecuencia mayor al 2% para alguno de los órganos, y solo *Colletotrichum* GM2 con un valor mayor a esa frecuencia en los tres órganos.

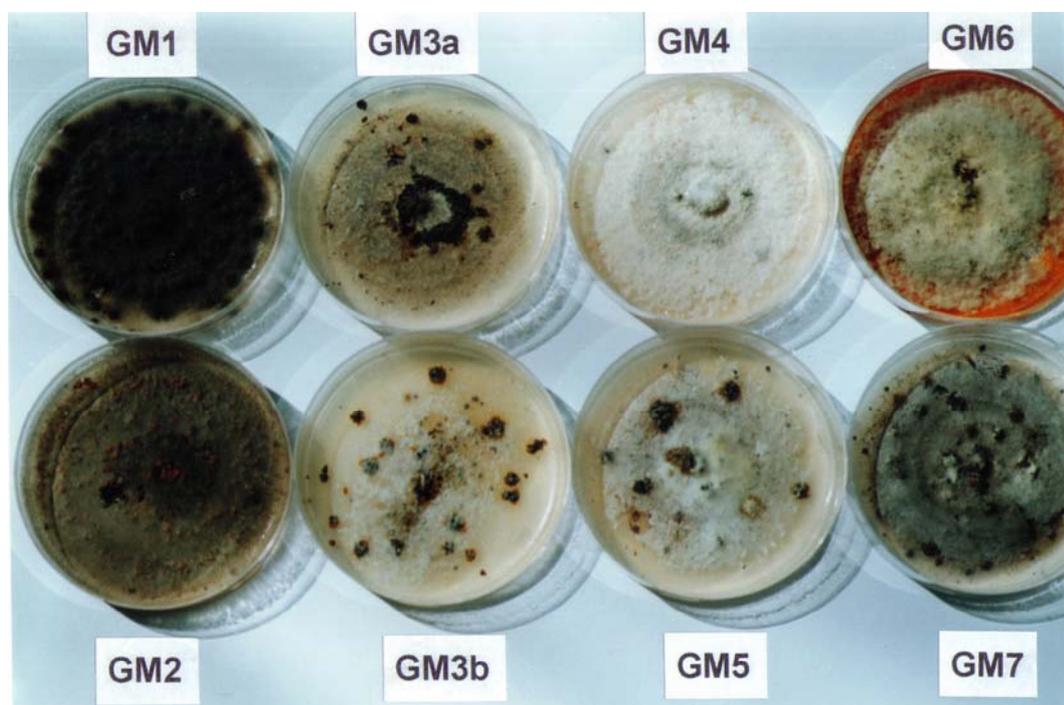
En dos órganos se encontraron 12 taxa, 4 taxa tenían una frecuencia mayor o igual al 2%; 7 taxa no tenían en ningún órgano frecuencias mayores o iguales al 2%, salvo *Colletotrichum* GM7, que estuvo presente al menos con esa frecuencia en ambos órganos, hoja y rama.

Los restantes 12 taxa fueron exclusivos de alguno de los tres órganos analizados: 5 taxa en 20 en pedúnculo, 5 en 19 fueron exclusivos de hoja y 2 en 18 de rama. De los taxa exclusivos, solo tres tuvieron una frecuencia de colonización mayor al 2%, uno en cada órgano, *Phoma* sp. (7,7%) en pedúnculo, *Colletotrichum* GM5 (5,1%) en hoja y *Colletotrichum* GM4 (2,2%) en rama.

**CUADRO 2:** Frecuencia relativa de los taxa aislados a partir de las diferentes partes de tejidos de *Citrus sinensis*.

FRECUENCIAS POR TEJIDO	Lámina	Pecíolo	Nodo	ENC	ENX	Cáliz	PC	PX
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissel	0,4	1,5	3,5	0,5		35	3	
<i>A. citri</i> Ellis y Pierce							1	
<i>Alternaria</i> sp.				2,5			8	
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	1		0,5	1,5		2		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) Vries	1,2		3,5	1,5		1		
<i>C. sphaerospermum</i> Penzig	1	0,5						
<i>Cladosporium</i> sp.	2,2	0,5				30	3	
<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds	0,2							
<i>Colletotrichum</i> GM2	96,2	38	25	18,5	1,5	17	1	
<i>Colletotrichum</i> GM3	1,8	4,5	21			1		
<i>Colletotrichum</i> GM4				6,5				
<i>Colletotrichum</i> GM5	5,4	4,5						
<i>Colletotrichum</i> GM6		0,5	0,5	1,5				
<i>Colletotrichum</i> GM7	3,2	20,5		16,5				
<i>Epicoccum purpurascens</i> Link			1,5			10	1	
<i>Fusarium lateritium</i> Nees			1,5	0,5		1	1	
<i>Fusarium</i> sp.			0,5			2	7	
<i>Glomerella septospora</i> Sivan. y Hsieh		4,5	6	5	3		4	
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.)Mason	0,2		1	1				
<i>Penicillium</i> sp.	1							
<i>Phoma nebulosa</i> (Pers.: S.F.Gray) Berk.						1		
<i>Phoma exigua</i> Desm.							2	
<i>Phoma</i> sp.						1	22	
<i>P. tracheiphila</i> (Petri) Kantach.y Gikach.						1		
<i>Sordaria fimicola</i> (Rob.y Desm.) Ces. y de Not.			1					
<i>Sphaeropsis tumefaciens</i> Hedges	0,2		0,5					
<i>Sporormiella minima</i> (Auers.) Ahm. y Cain	0,2	0,5				2		
micelio gris	0,6						2	
micelio hialino		0,5						
micelio blanco		2	0,5	1		1		
micelio anaranjado					2			1
<b>Total de aislamientos 1150</b>	574	156	133	113	13	105	55	1
<b>Total de taxa 31</b>	15	13	14	12	3	14	12	1
<b>Total fragmentos 1600</b>	500	200	200	200	200	100	100	100

Abreviaciones: ENC = corteza de entre nudo; ENX = xilema de entre nudo; PC = corteza de pedúnculo de fruto; PX = xilema de pedúnculo de fruto.



**FIGURA 1:** Características macroscópicas de los diferentes aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos.

#### 4.4 EL GÉNERO COLLETOTRICHUM

En los resultados previos de este estudio se encontró que el género *Colletotrichum* era el más abundante en los aislamientos obtenidos (Martínez, 2000). En un estudio más detallado de las especies encontradas fueron separados 8 grupos por la morfología de las colonias obtenidas (FIGURA 1).

En el CUADRO 4 se resumen las características fenotípicas de los cultivos de *Colletotrichum*, señalándose los grupos que surgen de analizar aislamientos con características similares.

El grupo morfológico 1 (GM1) fue tratado en un principio como perteneciente al grupo de *C. gloeosporioides sensu lato* en base a las características de la colonia. Sin embargo, fue posible obtener el estado sexual en la mayoría de las cepas estudiadas, las cuales producían ascosporas septadas que coincidían con la descripción de *Glomerella septospora* Sivan. y Hsieh (Anamorfo = *Colletotrichum taiwanense* Sivan. y

Hsieh.). Los aislamientos que constituían el GM1 poseían los caracteres culturales y microscópicos de *G. septospora* (Sivanesan y Hsieu, 1993).

Los GM3a y GM3b , separados en un principio por poseer el GM 3a micelio aéreo de color gris y esclerocios en la zona del inóculo y el GM 3b escaso micelio aéreo blanco y esclerocios distribuidos por todo el micelio, fueron unidos en un solo grupo morfológico (GM3) al no encontrarse diferencias morfológicas a nivel microscópico.

Una de las especies, aislada de lámina, poseía conidios fusoides y morfología de la colonia que coincidían con las descripciones de *Colletotrichum acutatum* Simmonds (Sutton, 1980).

Los restantes grupos morfológicos (GM2-GM7) fueron tratados, en un principio, como *C. gloeosporioides* s. l. dado que sus características eran coincidentes con las descripciones dadas para esta especie (Sutton, 1980).

Los aislamientos pertenecientes a los GM2 y GM7 fueron aislados con mayor frecuencia y en consecuencia se dispuso de mayor información sobre los distintos caracteres de cultivo.

Los diámetros de crecimiento en PDA a 6 días mostraron una gran diferencia entre cepas, incluso dentro de un mismo grupo morfológico. En general, el GM2 fue el que alcanzó un mayor diámetro de crecimiento, de 72-84 mm a los 6 días, excepto la cepa P5/1 que solo alcanzó 49 mm. El GM4 fue el de más lento crecimiento en el medio estudiado, 38 mm en 6 días, pero sólo una cepa fue estudiada debido a que este GM se aisló en muy baja frecuencia solo de ENC. En los restantes GM se solapó el rango del diámetro de crecimiento y no fue posible obtener datos concluyentes al respecto. Los caracteres microscópicos fueron más constantes ya que en general existió homogeneidad en las características estructurales entre los GM. El GM2 fue el grupo con conidios de mayor longitud y menor diámetro promedio. Esto resulta en que sea el único grupo con conidios de relación largo-ancho (L/A) cercana a 3. El rango inferior de medidas de este grupo se superpone con el rango superior de medidas del GM7, pero ocurre lo inverso con los rangos de los diámetros, el GM7 posee conidios en promedio más anchos, y su relación L/A es cercana a 2,5. Ambos grupos poseen

**CUADRO 3:** Frecuencia relativa de los taxa aislados a partir de los diferentes órganos de *Citrus sinensis*.

FRECUENCIAS POR ORGANO	Hoja	Rama	Ped. Floral
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissel	0,7	1,3	12,7
<i>A. citri</i> Ellis y Pierce			0,3
<i>Alternaria</i> sp.		0,8	2,7
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	0,7	0,7	0,7
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.)de Vries	0,8	1,7	0,3
<i>C. sphaerospermum</i> Penzig	0,8		
<i>Cladosporium</i> sp.	1,7		11
<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds	0,1		
<i>Colletotrichum</i> GM2	79,6	15	6
<i>Colletotrichum</i> GM3	2,6	7	0,3
<i>Colletotrichum</i> GM4		2,2	
<i>Colletotrichum</i> GM5	5,1		
<i>Colletotrichum</i> GM6	0,1	0,7	
<i>Colletotrichum</i> GM7	8,1	5,5	
<i>Epicoccum purpurascens</i> Link		0,5	3,7
<i>Fusarium lateritium</i> Nees		0,7	0,7
<i>Fusarium</i> sp.		0,2	3
<i>Glomerella septospora</i> Sivan. y Hsieh	1,3	4,7	1,3
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.)Mason	0,1	0,7	
<i>Penicillium</i> sp.	0,7		
<i>Phoma nebulosa</i> (Pers.: S.F.Gray) Berk.			0,3
<i>Phoma exigua</i> Desm.			0,7
<i>Phoma</i> sp.			7,7
<i>P. tracheiphila</i> (Petri) Kantach.y Gikach.			0,3
<i>Sordaria fimicola</i> (Rob.y Desm.) Ces. y de Not.		0,3	
<i>Sphaeropsis tumefaciens</i> Hedges	0,1	0,2	
<i>Sporormiella minima</i> (Auerswald) Ahmed y Cain	0,3		0,7
micelio gris	0,4		0,7
micelio hialino	0,1		
micelio blanco	0,6	0,5	0,3
micelio anaranjado		0,7	0,3
<b>Total de aislamientos 1150</b>	730	259	161
<b>Total de taxa 31</b>	19	18	20
<b>Total fragmentos 1600</b>	700	600	300

conidios cilíndricos. Los restantes grupos poseen longitudes de conidios en promedio menores, solo el GM5 se solapa con el GM7, pero en el diámetro los promedios exceden el rango superior del GM2. Debido a esto, los conidios de estos grupos poseen forma cilíndrico elipsoidal u ovoide con una relación L/A cercana a 2. En cuanto a este carácter, el GM7 es intermedio entre el GM2 y los restantes, pero las características de cultivo permiten diferenciarlo morfológicamente.

Otros caracteres microscópicos aparecen como característicos de determinados grupos. Las setas, un carácter particular del género *Colletotrichum*, fue encontrado en tres de las cepas estudiadas del GM2. Estas setas, características del género, son de pared engrosada y pigmentada, generalmente castaño oscuro, con o sin septos y de ápice agudo. La cepa N13/14 del GM3 fue la única encontrada fuera del GM2 con setas, pero éstas eran más pequeñas, menos pigmentadas y de ápice romo. Este hecho podría indicar que es un grupo heterogéneo y que es necesario un estudio más completo.

La presencia de esclerocios es un carácter constante en determinados cepas, pero al ser utilizado en la caracterización inicial para separar grupos, debe ser analizado en conjunto con otros caracteres. Los esclerocios estaban presentes constantemente en todas las cepas de los GM3, 5 y 7. Sin embargo, existe cierta variación en el tamaño y distribución en el micelio.

Se observaron clamidosporas en el micelio sumergido del GM5, pero como se estudió solo una cepa (P7/3) no es posible asegurar si este carácter es constante en el grupo. Las clamidosporas encontradas eran de forma esférica a oval y generalmente intercalares.

#### 4.4.1 Características de los grupos morfológicos

El **GM2** fue, a pesar del número de cepas estudiadas, un grupo muy homogéneo en cuanto a la forma y dimensiones de los conidios, así como a la morfología de la colonia. En estos aislamientos no fueron observados conidios de ápice truncado, así como tampoco setas conidiógenas, característicos de *Colletotrichum*

**CUADRO 4:** Resultados del estudio morfológico de *Colletotrichum* spp. por cepa y grupo morfológico.

GM	CEPA	Diam mm/6d	CONIDIOS $\mu\text{m}$				SETAS	Escler.	Clam.
			Largo	Ancho	L/A	Forma			
2	N1/12	84 $\pm$ 1,4	14,9 $\pm$	5,3 $\pm$ 0,46	2,8	cil	-	-	-
	PC11/8	84 $\pm$ 2,1	14,8 $\pm$	5,3 $\pm$ 0,52	2,8	cil.	-	-	-
	CZ8/8	81 $\pm$ 2,8	15,3 $\pm$	5,6 $\pm$ 0,47	2,7	cil.	+	-	-
	PC20/1	78 $\pm$ 2,9	15,9 $\pm$	5,4 $\pm$ 0,58	2,9	cil.	-	-	-
	ENC1/6	72 $\pm$ 4,5	15,5 $\pm$	4,9 $\pm$ 0,55	3,2	cil.	+	-	-
	P5/1	49 $\pm$ 1,0	15,2 $\pm$	5,1 $\pm$ 0,46	3,0	cil.	+	-	-
	P1/9	82 $\pm$ 1,0	15,1 $\pm$	5,3 $\pm$ 0,36	2,8	cil.	-	-	-
3	H4	51 $\pm$ 2,9	13,9 $\pm$	6,5 $\pm$ 0,45	2,1	cil. elip.	-	+	-
	N13/14	44 $\pm$ 3,7	n. e.	n. e.	n.e.	cil. elip.	+?	+	-
	CZ14/4	59 $\pm$ 3,5	n. e.	n. e.	n.e.	cil. elip.	-	+	-
4	ENC5	38 $\pm$ 1,9	12,8 $\pm$	5,9 $\pm$ 0,62	2,2	ovoide	-	-	-
5	P7/3	62 $\pm$ 1,3	14,2 $\pm$	5,5 $\pm$ 0,48	2,6	cil. elip.	-	+	+
6	ENC14	59 $\pm$ 4,4	13,4 $\pm$	6,4 $\pm$ 0,45	2,1	elip.	-	-	-
7	H7/16	62 $\pm$ 4,1	14,8 $\pm$	5,9 $\pm$ 0,44	2,5	cil.	-	+	-
	P4/4	48 $\pm$ 1,0	12,9 $\pm$	5,3 $\pm$ 0,49	2,4	cil.	-	+	-
	ENC3/3	58 $\pm$ 5,5	14,9 $\pm$	6,7 $\pm$ 0,34	2,2	cil. ovo.	-	+	-

Abreviaciones: GM = grupo morfológico; +/- = presente/ausente; L/A = relación largo/ancho del conidio; cil. = cilíndrico; elip. = elipsoidal; ovo. = ovoide; Escler. = esclerocios; Clam. = clamidosporas; n. e. = no estudiado.

*fragariae* Brooks (Smith y Black, 1990), y por lo tanto la existencia de esta última especie fue descartada de este trabajo. El GM2 se caracterizó por poseer conidios cilíndricos con un promedio de 15,2 x 5,3  $\mu\text{m}$  (rango de promedios de 14,8-15,9 x 4,9-5,6  $\mu\text{m}$ ) y rango general 11,7-18,8 x 4,2-6,7  $\mu\text{m}$ . El promedio de los diámetros en PDA a los 6 días fue de 80 mm para este grupo, excluyendo la cepa aberrante P5/1, como se indicó anteriormente. El rango de crecimiento varió entre cepas entre 72-84 mm a los 6 días. Se observaron setas en tres de las cepas estudiadas, CZ8/8, P5/1 y ENC1/6. Estas se encuentran en diferente abundancia pero fueron constantemente pigmentadas, de ápice agudo y septadas. El rango de medidas encontrado para éstas fue de 65-95 x 3-4  $\mu\text{m}$  y de 0-5 septos por seta. En ninguna de las cepas estudiadas fueron encontrados esclerocios o clamidosporas. Algunas cepas produjeron el estado

sexual al ser aisladas coincidiendo con la descripción de *Glomerella cingulata* o *G. cingulata* var. *minor* Wollenw. No se realizó un estudio de estas cepas debido a que la aparición del estado sexual solo se da en cepas auto-fértiles en condiciones favorables (Bryson et al., 1992), siendo la mayoría de las encontradas en el presente trabajo presumiblemente auto-estériles.

Las características halladas para este grupo eran coincidentes con diversas descripciones de *C. gloeosporioides sensu stricto*, siendo así llamado a este grupo (Sutton, 1980, 1992).

El concepto actualmente aceptado para esta especie incluye a individuos que poseen colonias gris claro a gris oscuro, con setas presentes o ausentes, esclerocios ausentes, conidios formados en masas salmón claro, de forma cilíndrica, ápice obtuso y de 12-17 x 3,5-6,0  $\mu\text{m}$  (Sutton, 1992).

Por ejemplo, Smith y Black (1990) encontraron, en un estudio sobre las especies de *Colletotrichum* en frutilla, cepas coincidentes morfológicamente con las de este grupo. Las colonias eran de color gris u oliva gris, no producían setas constantemente y poseían conidios cilíndricos que medían 12,9-16,1 x 4,4-5,4  $\mu\text{m}$ , similares a los nuestros. Sin embargo, estos autores sólo estudiaron dos cepas. El crecimiento en PDA a 24°C durante 5 días fue de unos 68 mm. Por traspolación, el crecimiento a los 6 días es de 82 mm de diámetro, similar a nuestros valores. Estas cepas fueron denominadas como *C. gloeosporioides*.

En un estudio similar, pero sobre cepas de *C. gloeosporioides* provenientes de citrus, Agostini et al. (1992) separaron tres grupos de acuerdo al síntoma que provocaban en diferentes especies de cítricos o a la morfología de la colonia. Estas fueron llamadas como FGG, SGO y KLA, según fueran provenientes de tejidos senescentes o necróticos, de color anaranjado, de crecimiento lento o provenientes de antracnosis de limas, respectivamente. Nuestros aislamientos del GM2 coinciden con sus cepas FGG (por "Fast Growing Grey") en los caracteres de cultivo. Los conidios del grupo FGG fueron de mayor longitud que los de los otros dos grupos y poseían ápices curvos, contra ápices fusoides en SGO y KLA. Sin embargo, las medidas de los conidios fueron expresadas en este trabajo según área y perímetro, lo que impide una comparación más concreta. Al menos una cepa de este grupo produjo el estado sexual

y la mayor parte de ellas produjeron setas en PDA. Los diámetros de cultivo fueron tomados en PDA a los 7 días. Las cepas del grupo FGG crecieron tres veces más rápido que las de los restantes grupos. Tomando el promedio de 80 mm de diámetro a los 6 días obtenido en el presente trabajo, el área es de 50 cm<sup>2</sup>, traspolando al día 7 son 58 cm<sup>2</sup>, que cae exactamente dentro del rango dado para esta temperatura por Agostini et al. (1992). Los otros grupos no superaron los 25 cm<sup>2</sup> de colonia para la misma temperatura. Los tres grupos fueron tratadas por Agostini et al. (1992) como *C. gloeosporioides*. En un trabajo posterior fue determinado, mediante la realización de PCR con primers específicos, que los grupos SGO y KLA pertenecían a *C. acutatum*, mientras que el grupo FGG pertenecía a *C. gloeosporioides* s. s. (Brown et al., 1996).

El **GM3** presenta conidios de forma cilíndrica elipsoidal, ocasionalmente con una constricción al medio, con promedio de 13,9 x 6,5 µm, un rango de 12,5-15,8 x 5,4-7,5 µm y relación L/A cercana a 2, solo una cepa fue incluida en el análisis estadístico. Además, el promedio de crecimiento en PDA a los 6 días fue de 51 mm de diámetro con un rango de 44-59 mm. Todas las cepas produjeron esclerocios negros en el micelio, pero con diferencias en cuanto a la abundancia, distribución en el micelio y tamaño. Al menos una cepa produjo setas, pero diferentes en pigmentación y forma a aquellos del GM2, sinuosas y con 2 septos. Este grupo no parece ser homogéneo de acuerdo a la variación observada en la morfología de la colonia. Algunas cepas conservaron los caracteres, mientras que, por ejemplo en la H4, el micelio aparece más denso y oscuro que en las demás. Asimismo, la presencia de setas en una cepa puede indicar que este carácter no es constante, como ocurre con el GM2, o que más de un grupo morfológico haya sido incluido dentro del concepto del GM3. Un estudio más completo, con un mayor número de cepas es necesario para resolver esta interrogante. Fue imposible adjudicar el nombre de una especie a este grupo siguiendo la bibliografía correspondiente, aunque existen grupos separados de *C. gloeosporioides* s. l. con medidas de conidios similares a las observadas en el presente trabajo, pero son poco conocidos sus caracteres culturales. La separación del GM3 de *C. gloeosporioides* s.s. no reviste mayores problemas debido a la notoria aparición de

esclerocios, carácter ausente en esta última especie y a los conidios anchos, mayores a 6  $\mu\text{m}$  (Sutton, 1992).

El **GM4** fue aislado solamente de ENC, las cepas eran muy homogéneas en su morfología y por lo tanto solo se estudió una cepa. La forma de los conidios era en general ovoide o anchamente elipsoide. El GM4 posee el largo de conidios más pequeño encontrado en este estudio, promediaron 12,8 x 5,9  $\mu\text{m}$  con un rango de 11,6-14,2 x 5,0-7,5  $\mu\text{m}$  y una relación L/A 2,2. También fue la especie con crecimiento promedio más lento en PDA, 38 mm a los 6 días, rango de 34-40 mm. En el micelio no se encontraron setas, esclerocios o clamidosporas.

El GM6 es similar en ciertos aspectos al presente grupo, por la forma de los conidios y la ausencia de estructuras en el micelio, sin embargo este último grupo se diferencia en base al mayor diámetro de crecimiento en PDA, mayor densidad y color de la mata y pigmentación del medio. A pesar de la homogeneidad del grupo y de poseer conidios cortos y anchos, fue imposible asociarlo a ninguna de las especies actualmente escindidas de *C. gloeosporioides s. l.* (Sutton, 1992).

El **GM5** fue aislado solamente de hojas, tanto de fragmentos de lámina como de pecíolo. Este grupo posee conidios con un promedio de 14,2 x 5,5  $\mu\text{m}$ , rango 11,7-15,8 x 5,0-6,7  $\mu\text{m}$  dando esto una relación L/A de 2,6. El diámetro de crecimiento en PDA fue de 60-63 mm, con un promedio de 62 mm. El carácter distintivo a nivel microscópico de este grupo fue la presencia de clamidosporas de forma esférica a elipsoidal. El GM5 comparte muchas características macroscópicas con el GM3, como color del micelio y presencia de esclerocios, siendo difícil de separar en un principio en base solo a los caracteres culturales (FIGURA 1). Sin embargo, a las 4 semanas de crecimiento el GM5 desarrolla un micelio más denso y pigmentado y además posee conidios en promedio más angostos y por lo tanto con una relación L/A mayor que los del GM3. Las clamidosporas no fueron observadas en ninguno de los demás grupos. Este grupo fue excluido de *C. gloeosporioides s.s.* al poseer una combinación de caracteres excluyente, como presencia de clamidosporas y esclerocios (Sutton, 1992).

El **GM6** fue el aislado con menor frecuencia de todos los grupos de *C. gloeosporioides s. l.* estudiados. Este grupo fue separado inicialmente por la capacidad de pigmentar de color anaranjado el medio de PDA y por su colonia amarillento grisáceo. Este grupo posee conidios elipsoidales de 13,4 x 6,4  $\mu\text{m}$  en promedio, con un rango de 11,7-15,8 x 5,8-7,5  $\mu\text{m}$  y una relación L/A 2,1. El crecimiento en PDA varió de 55-65 mm, promedio 59 mm, a los 6 días. No posee clamidosporas o esclerocios. La morfología de la colonia puede confundirse en un inicio con la del GM4, como se señaló previamente. Sin embargo, la pigmentación del medio y la forma elipsoidal de los conidios, en lugar de ovoides y medianamente constreñidos en el GM4, es definitoria. Este grupo fue mantenido dentro de *C. gloeosporioides s. l.* al no encontrarse caracteres particulares como para aceptarlo dentro de una entidad diferente (Sutton, 1992).

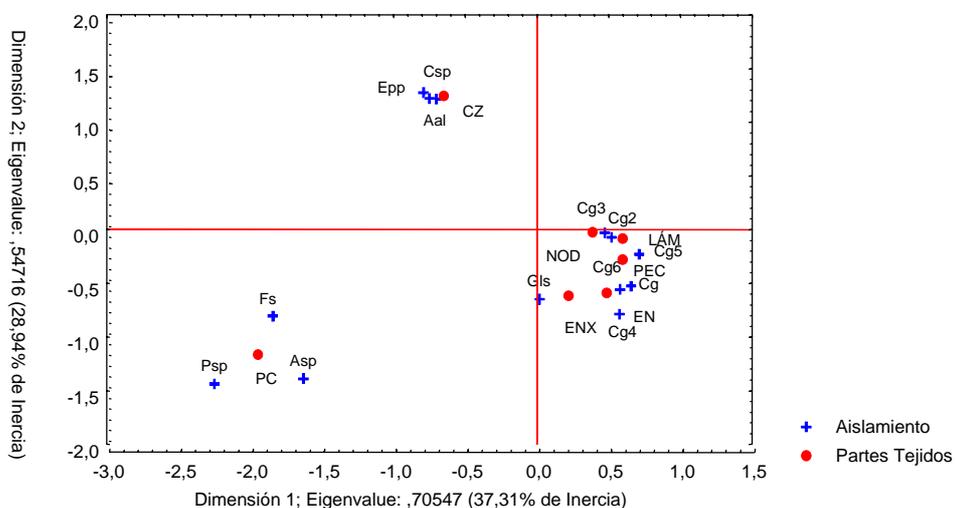
El **GM7** fue el grupo con mayor frecuencia de aislamientos, luego del GM2. En un principio estos grupos pueden diferenciarse debido a que la colonia presenta micelio algodonoso blanco en lugar del micelio gris claro, característico del GM2. Posteriormente, desarrolla una colonia gris claro pero zonada y con esclerocios que la diferencia del GM2. Los conidios fueron en promedio cilíndricos, de 14,2 x 6,0  $\mu\text{m}$  (rango de promedios 12,9-14,9 x 5,3-6,7  $\mu\text{m}$ ) y rango general 13,3-17,5 x 4,6-7,1  $\mu\text{m}$  y por lo tanto con una relación L/A cercana a 2,5, excepto para la cepa ENC3/3 que poseía un alto número de conidios con forma ovoide.

Los diámetros de crecimiento en PDA variaron de 47-66 mm a los 6 días para las diferentes repeticiones, promedio entre cepas de 56 mm. Este grupo posee caracteres en común con *C. coccodes* (Wallr.) S. Hughes y *C. gloeosporioides s. s.* El primero produce colonias similares, tanto por el color del micelio, como por la presencia de esclerocios. Sin embargo, *C. coccodes* posee conidios en promedio más largos y finos, de 16-24 x 3-4  $\mu\text{m}$ . *C. gloeosporioides s. s.* posee similar rango de medidas de conidios y color de la colonia, pero la presencia de esclerocios descarta inmediatamente esta posibilidad (Sutton, 1992).

## 4.5. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA

### 4.5.1 Diferencia entre tejidos

El análisis de correspondencias simple realizado sobre 13 especies provenientes de cáliz, corteza del pedúnculo, nodo, xilema de entrenodo, corteza de entrenodo, pecíolo y lámina mostró que los tres primeros ejes coordinados explicaban el 100 % del total de la inercia indicando un buen ajuste de los datos con el modelo (FIGURA 2, Anexo). El eje 1 explica el 37.3 % de la inercia total y permite separar el conjunto de hongos de cáliz y corteza de pedúnculo del resto de los tejidos. *Epicoccum purpurascens.*, *A. alternata*, *Cladosporium* spp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma* spp. contribuyen con 72.7 % a la inercia de este eje y caracterizan las tres primeras al cáliz y las tres últimas a la corteza del pedúnculo (FIGURA 2).



**FIGURA 2:** Análisis de correspondencia simple de partes de tejidos de acuerdo a la composición de endófitos con frecuencia mayor a 5%.

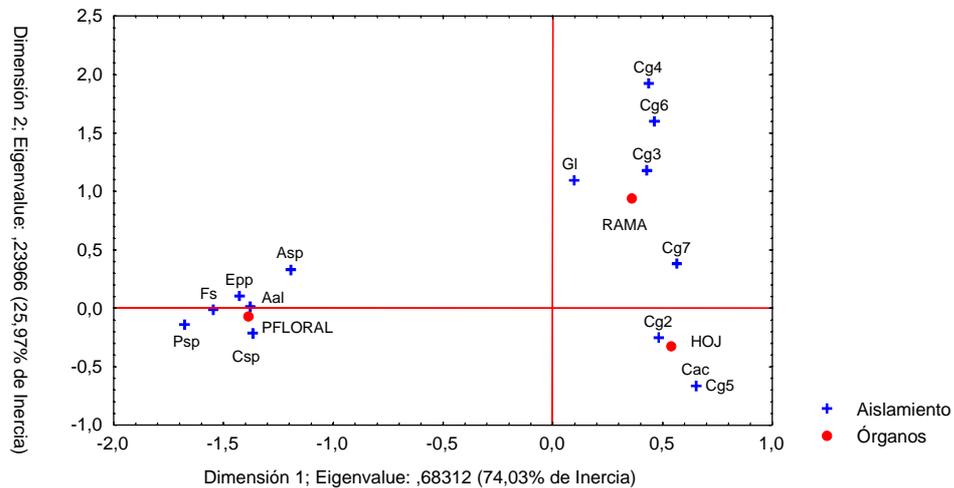
Un conjunto constituido por *Glomerella septospora* y los grupos morfológicos discriminados de *Colletotrichum* spp. estuvieron asociados al resto de los tejidos (nodo, xilema de entrenodo, corteza de entrenodo, pecíolo y lámina) y son las que fundamentalmente contribuyen con un 26.1 % a la inercia de este eje.

El eje 2 explica el 28.9 % de la inercia total de este eje y permite diferenciar cáliz de corteza de pedúnculo. Un conjunto de especies que incluye *Phoma* spp., *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp., asociadas con la corteza del pedúnculo, contribuyen con 30.2 % a la inercia de este eje. *Alternaria alternata* y *Cladosporium* sp. que aportan el 50 % a la construcción de este eje caracterizan al cáliz. Todos los tejidos restantes están caracterizados por las cepas de *Colletotrichum* que explican algo menos del 20 % de la inercia total de este eje.

El tercer eje que contribuye con solo el 15 % pone en evidencia, sin embargo, un gradiente de los aislamientos de *Colletotrichum* que caracterizan nodo, lámina, pecíolo y corteza de entrenodo.

#### 4.5.2 Diferencias entre órganos

El análisis de correspondencias simple realizado sobre 14 especies provenientes de pedúnculo, hoja y ramita, mostró que los dos primeros ejes coordinados explicaban el 100 % del total de la inercia indicando un buen ajuste de los datos con el modelo (FIGURA 3, Anexo). El eje 1 explica el 74 % de la inercia total y permite separar el conjunto de hongos del pedúnculo de hoja y ramita. *Epicoccum purpurascens* Link, *A. alternata*, *Cladosporium* spp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma* spp. contribuyen con 74.3 % a la inercia de este eje.



**FIGURA 3:** Análisis de correspondencia simple de órganos de acuerdo a la composición de endófitos con frecuencia mayor a 2%.

Un conjunto constituido por *Glomerella septospora* y los grupos morfológicos discriminados de *Colletotrichum* spp. estuvieron asociados a los otros órganos son las que fundamentalmente contribuyen con un 25.7 % a la inercia de este eje.

El eje 2 explica el 25.9 % de la inercia total de este eje y permite diferenciar ramita de hoja. Un conjunto de cepas (GM2 y GM5) asociadas con las hojas, contribuyen con 19 % a la inercia de este eje. La rama está caracterizada por los restante grupos morfológicos de *Colletotrichum* y por *Glomerella septospora*. Las cepas que caracterizan las ramas son las que permiten establecer esta diferencia. Las ramitas aportan el 75.7 % a la inercia.

## 5. DISCUSIÓN

El número total de 31 taxa obtenidos, está de acuerdo en general con reportes previos de hongos endófitos analizados en regiones similares a la nuestra (Bettucci et al. 1997, 1999, Lupo et al. 2001). Sin embargo, varias puntualizaciones pueden realizarse al respecto. De acuerdo al sitio de estudio, existe gran variación en el número final de especies obtenidas, con un máximo de 418 taxa para dos hospederos distintos en una zona tropical, donde presumiblemente existe hiperabundancia de estos hongos (Arnold et al., 2000). Sin embargo, es más aproximado comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos para otros hospederos en nuestro país. Para el caso de *Eucalyptus* spp. de diferentes regiones de Uruguay, el número de taxa varió desde 28, en cápsulas, flores y semillas, hasta 59 en ramas sanas y sintomáticas (Bettucci et al. 1997, 1999, Lupo et al. 2001). La variación en el número de fragmentos estudiados fue muy grande: entre 600 en rebrotes y 1240 de cápsulas, flores y semillas de *Eucalyptus* spp. A partir del órgano del que se extrajo el mayor número de segmentos, se obtuvo el menor número de taxa (en cápsulas y flores). Esto demuestra que al aumentar el número de segmentos no necesariamente aumenta el número de taxa obtenidos. Por el contrario, el número de taxa puede estar relacionado con el tejido u órgano estudiado, incluso para una misma región. Para el caso de eucaliptos, las técnicas de cultivo y manejo son muy diferentes a las empleadas para cítricos, por ejemplo, en cuanto a poda y aplicación de fitosanitarios, lo que dificulta hacer comparaciones que permitan obtener conclusiones más precisas.

Takeda et al. (2003) obtuvieron un total de 33 taxa a partir de 800 segmentos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire cultivadas en el sur de Brasil. Las plantas de “yerba mate” son constantemente podadas, como es el caso de los cítricos, pero no son realizadas aplicaciones químicas debido a la utilización de hojas y ramas para la preparación de “yerba mate”. Ambos resultados, de acuerdo al número de especies, concuerdan con reportes previos en que se puntualiza la baja diversidad de endófitos encontrada en especies arbóreas o arborescentes que son podadas regularmente (Sieber-Canavesi y Sieber, 1987).

En el estudio de Takeda et al. (2003) en *Ilex paraguariensis* fue encontrado que *Guignardia philoпрina* (Berk. y Curt.) Van der Aa era la especie dominante aislada como endófito. En el presente trabajo ocurre una situación similar para *C. gloeosporioides* s. l., ya que es la única especie dominante en todos los tejidos junto a un número variable de especies secundarias.

Existen varios estudios sobre la ocurrencia de hongos endófitos en diferentes especies de cítricos. Por ejemplo, Whiteside (1993) señala que *C. gloeosporioides* es el principal colonizador asintomático de hojas de cítricos, lo cual está de acuerdo a los resultados aquí obtenidos. En otros trabajos, se señala a *Guignardia citricarpa* Kiely causante del “black spot”, una enfermedad cuarentenaria, como el principal colonizador asintomático de hojas de cítricos. Schüepp (1961), en uno de los primeros estudios sobre hongos endófitos, analiza la presencia de *G. citricarpa* en diferentes especies de *Citrus*, señalando por primera vez la importancia de la etapa endófitica para algunos patógenos. Más recientemente, Azevedo et al. (2000) estudiaron fragmentos asintomáticos y semillas de diferentes especies de cítricos en busca de hongos y bacterias endófitos. En ese trabajo no obtienen ningún aislamiento de semillas, pero de hojas de *Citrus deliciosa*, *C. reticulata* y *C. reticulata* x *C. sinensis* obtienen un total de 407 aislamientos de hongos endófitos, de un número de fragmentos no especificado. Los aislamientos pertenecían principalmente a los géneros *Colletotrichum* y *Guignardia*, siendo alrededor de 100 aislamientos pertenecientes a *G. citricarpa*.

Durán et al. (2005) en un trabajo similar al presente, registran en *Citrus limon* (L.) Burm. *Colletotrichum gloeosporioides* y *Guignardia citricarpa* como los endófitos más abundantes en hojas. Sin embargo, estos autores solo estudian hojas de limonero y comparaciones con otros órganos son imposibles de obtener.

Debido que *G. citricarpa* no fue encontrada en el presente trabajo, es de suponer que esta especie no está presente en el país, o no posee una etapa endófitica dominante en nuestro país por las condiciones de manejo, o bien esta etapa es favorecida por condiciones climáticas más cálidas, como las que ocurren en San Pablo o Tucumán, donde se realizaron los trabajos citados.

Los mismos autores (Azevedo et al., 2000) señalan el aislamiento de 16 especies de hongos endófitos de hojas de “banano” (*Musa acuminata* Colla)

provenientes de San Pablo. Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *Xylaria* sp., *Colletotrichum musae* y *Cordana musae* (Zimm.) Van Hohnel (Azevedo et al., 2000). *Colletotrichum musae* es el agente causal de la podredumbre post cosecha en bananas, desarrollando una infección quiescente hasta que le son dadas las condiciones para pudrir los frutos. En este caso son notorias las similitudes con la situación de *C. gloeosporioides* y *Citrus* spp.

Para el caso del "cajuero", *Anacardium occidentale* L., cultivado en los estados del noreste de Brasil, *C. gloeosporioides* y *Fusarium solani* fueron los principales hongos endófitos aislados de hojas (Azevedo et al., 2000). *C. gloeosporioides* es el principal patógeno de este cultivo y contra el cual deben realizarse aplicaciones químicas permanentes para su control.

Según estos reportes, *Colletotrichum* está ampliamente distribuido como endófito en numerosas especies cultivadas, incluso causando infecciones asintomáticas en especies para las cuales ha sido reportado como uno o el principal patógeno. Así, especies patógenas de *Colletotrichum* pueden colonizar tejidos de plantas que son o no huéspedes habituales y desarrollarse en forma no patogénica. Estos resultados confirman que los hongos endófitos no solo son neutrales o beneficiosos para su huésped, gran número de patógenos poseen una etapa endofítica previa a la patogénesis.

Los conceptos habituales sobre los hongos simbióticos, a los que se les otorga solo una estrategia de vida, según si el huésped sea beneficiado (mutualismo), perjudicado (parasitismo) o no tenga efecto (comensalismo), son cada vez menos aceptados.

En este sentido, Redman et al. (2001), encontraron que cepas de *Colletotrichum* spp. patógenos de determinada especie, pueden colonizar asintomáticamente y expresar relaciones mutualísticas o comensalísticas en plantas no conocidas previamente como hospederos.

Queda aún por determinar si especies patógenas para determinado huésped pueden ser mutualistas en determinadas condiciones. Esto podría ser así para el presente trabajo, ya que al menos *Colletotrichum* spp., *Sphaeropsis tumefaciens* y *Phoma*

*tracheiphila*, reportados como patógenos, son capaces de colonizar diferentes órganos de citrus sin causar síntomas aparentes.

El cambio en el modo en que se da esta relación ha sido interpretado de diversas maneras según los resultados obtenidos. El concepto más aceptado previamente es el de la existencia de especies que son patógenas o no según causen daño en determinado huésped. Este concepto debió ser ajustado al encontrarse cepas capaces de causar síntomas sobre su huésped solo en determinadas condiciones, como la etapa fenológica del huésped, el clima, la nutrición, etc. Entonces, una respuesta fisiológica del hongo a factores ambientales bióticos o abióticos, está determinada genéticamente en una relación simbiótica

Algunas especies de hongos podrían de esta manera expresar diferentes estrategias de vida, dependiendo de la planta huésped y/o las condiciones ambientales. Esto puede ser reafirmado ante el aislamiento de hongos patógenos y no patógenos de los mismos tejidos asintomáticos en el presente trabajo. Inversamente una misma especie puede encontrarse en tejidos sanos y en aquellos con algún tipo de síntoma.

Esto reafirma el concepto de infección quiescente o latente al permanecer determinada especie en ese estado luego de la penetración.

Redman et al. (2001) encontraron que la dirección que toma la relación, patogénica, beneficiosa o neutral de *Colletotrichum* spp., no está determinada genéticamente en el hongo sino que está determinada por el huésped y por los diferentes factores que influyen sobre la expresión de dicha relación.

Así como Freeman y Rodriguez (1993) convirtieron una cepa de *Colletotrichum magna*, altamente patógena, en un mutante mutualista o comensalista, este fenómeno está ampliamente distribuido en la naturaleza.

Según este concepto, una comunidad de hongos endófitos no se compone de aquellos patógenos que causarán enfermedad, mutualistas que brindarán beneficios y saprofitas que degradarán biomasa. En cierto lugar, una misma cepa de un hongo endófito puede ser patógeno en determinado huésped, proveer de beneficios, como resistencia a insectos, a la sequía o fomentar el crecimiento en otra especie vegetal, o colonizar asintomáticamente a otra como comensal.

En un cultivo comercial de “mango” (*Mangifera indica* L.), Azevedo et al. (2000) encontraron que los principales patógenos de este cultivo, *Dothiorella* sp. y *Phomopsis mangiferae* Ahmad, aparecen en forma endófito previo a la floración. Los aislamientos de ambas especies fueron significativamente superiores en árboles no tratados químicamente que en aquellos con aplicaciones de cobre.

En manzanos cv. “Golden Delicious” se encontró que el número de hongos filamentosos y levaduras epífitos y de *Alternaria* spp. endófitas, desciende considerablemente con las aplicaciones de fungicidas (Teixidó al., 1999). De forma similar, es probable que las aplicaciones de productos químicos en el monte estudiado en el presente trabajo hagan disminuir la infección por hongos endófitos, o bien favorezcan la colonización por determinado grupo con ventajas frente a estas condiciones.

Dentro del resto de los aislamientos obtenidos, los pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Phoma*, fueron determinados hasta especie en lo posible. Hasta el momento no existe un completo estudio que permita delimitar especies en forma fehaciente (Sutton, 1980). Para estos géneros sería necesario realizar un estudio más completo, como el realizado para *Colletotrichum*, para resolver su identidad. Debido a su baja frecuencia fue descartada esta posibilidad.

*Alternaria* spp. ha sido citada como causante de manchas foliares y podredumbre de frutos (Timmer et al., 2000), siendo además un género comúnmente aislado como endófito en numerosas especies vegetales.

De los aislamientos obtenidos de cáliz, uno fue identificado como *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. y Gik., que ha sido reportada como común en restos de diversas especies de citrus (Sutton, 1980).

*Sphaeropsis tumefaciens* Hedges fue aislado de las hojas y nodos estudiados, aunque en baja frecuencia. Esta especie es reportada como causante de agallas y secado de ramas en cítricos (Timmer et al., 2000). Los síntomas que produce esta especie pueden estar encubiertos por otro tipo de daño en montes comerciales de Uruguay y su control es sencillo al podar las ramas afectadas.

Dentro del género *Fusarium* existen varias especies señaladas como causantes de enfermedades en diferentes especies de cítricos. Sin embargo, la mayoría de

nuestros aislamientos pertenecían a *F. lateritium* Nees, una especie que hasta el momento no se ha reportado como asociada a ninguna de las enfermedades conocidas para los cultivos comerciales (Timmer et al., 2000).

Para los restantes aislamientos obtenidos, los pertenecientes a los géneros *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Sordaria* y *Sporormiella*, son hongos generalistas comúnmente aislados como endófitos o de restos vegetales en descomposición.

Dentro de los aislamientos de tejidos, se encontró que existen para las condiciones del estudio, ciertas comunidades bien definidas para cada tejido en particular. La comunidad de hongos en cáliz y corteza de pedúnculo se caracterizó por poseer un mayor componente de hongos generalistas, pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Phoma*. Las dos primeras caracterizaron al cáliz. Diferentes especies de éstos géneros son comúnmente aislados de tejidos asintomáticos en diversos estudios sobre comunidades de hongos endófitos (Petrini, 1991). La ausencia de hongos patógenos en estos tejidos, podrían reforzar la idea de que estos no llegan al fruto mediante micelio desde tejidos cercanos, sino mediante esporas que infectan directamente el fruto. Este es el caso comúnmente reportado para *Colletotrichum* (Timmer et al., 2000).

Los demás tejidos se caracterizan por la frecuencia de los diferentes GM de *Colletotrichum* que colonizaría éstos tejidos debido a la mayor permanencia en el árbol. Solo en cáliz aparece *C. gloeosporioides* (GM 2) en frecuencias comparables. El gradiente en los diferentes GM de *Colletotrichum* diferencia a los restantes tejidos, pudiendo indicar una cierta preferencia de determinados grupos por un tejido. En tal caso, es notoria la aparición del GM 4 solo en corteza de entrenudo, del GM 5 solo en lámina y pecíolo (hoja) y la ausencia de *Glomerella septospora* en lámina. Las causas de estas preferencias son desconocidas, pero factores como características química, topografía y permanencia de los tejidos, son los factores más probables que pueden influir en este gradiente (Petrini, 1996).

En el caso de los aislamientos por órgano, el pedúnculo de fruto se separa de hoja y rama. La comunidad que caracteriza a este órgano esta representada por hongos generalistas de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* y

*Phoma*. La casi ausencia de otros hongos, en frecuencias importantes, exceptuando a *C. gloeosporioides* (GM 2), indican que la corta permanencia de este órgano en la planta solo permite que un reducido grupo de hongos saprófitas y comunes sean capaces de infectarlo en forma notoria. Sin embargo, dentro de los aislamientos de *Phoma* aparece *P. tracheiphila*, causante del “mal seco” de los cítricos pero solo reportada en ramas (Timmer et al., 2000). Este órgano posee la mayor diversidad de especies (20) encontrada, si bien fue el órgano con menor número de fragmentos estudiado. Los restantes órganos, hoja y rama, están caracterizados por *Glomerella* y *Colletotrichum* spp. Entre rama y hoja las diferencias son explicadas solo por las frecuencias de aparición de los distintos GM de *Colletotrichum*. *C. gloeosporioides* (GM 2) y GM 5 caracterizaron a la hoja y los restantes GM y *G. septospora* caracterizaron la comunidad en rama. El área expuesta por las hojas, junto con el tipo de tejido, parecen favorecer la llegada e infección de esporas de *C. gloeosporioides*, convirtiéndose estas en un gran reservorio de inóculo latente para esta especie. Estos resultados están de acuerdo a observaciones previas de Timmer et al. (2000), quienes consideran a este órgano la principal fuente de inóculo de la especie. Una vez que las hojas mueren y caen al suelo, las condiciones ambientales favorecen la producción de acérvulos y la esporulación. Los conidios producidos en estas condiciones infectarían a los frutos jóvenes, permaneciendo en forma latente hasta la maduración de éstos. La falta de una determinación final, impide obtener conclusiones sobre el ciclo de vida y función de los restantes GM. Para el caso de *G. septospora*, que caracteriza la comunidad en rama, solo ha sido reportada previamente en *Styrax formosanus* Matsumura (Styracaceae).

El género *Colletotrichum*, por la frecuencia de aislamientos en el presente trabajo y la importancia en patología vegetal, mereció un tratamiento especial.

La taxonomía de este género ha sufrido numerosas modificaciones desde su creación de acuerdo a como han ido cambiando los conceptos genéricos de delimitación. Los límites utilizados en su delimitación han variado, a su vez, de acuerdo al conocimiento más profundo sobre la importancia de determinadas estructuras en el ciclo de vida del hongo.

Así, alrededor de 900 especies fueron descritas dentro de lo que hoy es aceptado como la variación encontrada dentro de *C. gloeosporioides*, la especie más común. La mayoría de estas especies son solamente variaciones fisiológicas adaptables a determinado hospedero. Muchas especies han sido separadas más recientemente en base a estudios sobre caracteres fisiológicos, bioquímicos o moleculares, pero muchas de ellas pueden haber sido descritas previamente en base solo a caracteres morfológicos de dudosa aplicación.

Por ejemplo, para *C. acutatum*, tenido como una sola especie, se determinó en un estudio filogenético, que al menos 7 grupos o especies diferentes están involucrados bajo un mismo concepto específico (Johnston y Jones, 1997). Posteriormente, esos grupos fueron reconocidos como diferentes en base a las diferencias encontradas a nivel cultural y morfológico (Lardner et al., 1999).

El caso de *C. gloeosporioides* es más complejo ya que no están encubiertas diferentes especies bajo un único concepto, fueron creadas 900 especies bajo uno o pocos conceptos de dudoso valor y aplicación. El camino inverso al realizado para *C. acutatum*, reconocer especies separables del grupo de *C. gloeosporioides s. l.* en base a un conjunto de caracteres con validez, permitirá asociar esos nuevos conceptos con alguna de las 900 especies previamente creadas y tratadas como sinónimos. La situación es muy complicada ya que para determinadas especies no existe material de referencia.

## 6. CONCLUSIONES

Los tejidos asintomáticos de *Citrus sinensis* se hallan colonizados ampliamente por hongos endófitos, como ha sido reportado previamente para todas las especies vegetales estudiadas.

Los tejidos más activos y blandos como lámina, pecíolo y cáliz son los más colonizados por hongos endófitos, y los xilemáticos los que poseen menor número de hongos endófitos. La corteza posee niveles de colonización intermedios de acuerdo al número de aislamientos obtenidos.

El número total de aislamientos obtenidos es muy variable, desde 574 aislamientos en 500 fragmentos de lámina de hoja, hasta 1 aislamiento en 100 fragmentos para el xilema del pedúnculo.

*Colletotrichum* spp. es el endófito fúngico más común en tejidos de *C. sinensis*, siendo dentro de este género *C. gloeosporioides* la especie más abundante.

*C. gloeosporioides* alcanza un máximo de abundancia relativa de 96,2 en la lámina, y no fue aislado de xilema del pedúnculo, único tejido en el que no aparece.

En el cáliz y corteza del pedúnculo, otros hongos más generalistas como *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum purpurascens* y *Phoma* spp., fueron las especies más abundantes en los aislamientos, teniendo *Colletotrichum* spp. una importancia secundaria.

La baja riqueza de especies encontradas, en relación a otras especies arbóreas puede estar relacionada con el efecto de los fungicidas utilizados en estos cultivo que reduce no sólo los hongos patógenos sino también a los saprótrofos.

## 7. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la composición de hongos endófitos en lámina, pecíolo, cáliz, corteza y xilema de pedúnculo y nudo y entre nudo de ramas de *Citrus sinensis*. El material vegetal fue obtenido en la región centro oeste de Uruguay. Se estudiaron 1600 fragmentos asintomáticos provenientes de diferentes tejidos de *Citrus sinensis*, mediante esterilización superficial e incubación en placa, para detectar la presencia de hongos endófitos. En total se estudiaron 500 fragmentos de hoja, 200 de pecíolo, 100 de cáliz, 100 de corteza de pedúnculo de fruto, 100 de médula de pedúnculo de fruto, 200 de nudo, 200 de corteza de entre nudo y 200 de médula de entre nudo. En total fueron obtenidos 1150 aislamientos de todos los tejidos analizados, variando desde 574 en hoja hasta 1 en médula de pedúnculo. El género de hongos endófitos más abundante fue *Colletotrichum*, para el cuál se realizó un estudio taxonómico por separado. Dicho estudio permitió separar 8 grupos morfológicos de los cuales fue identificado *C. gloeosporioides*, el agente causal de antracnosis de ramas y frutos, como el endófito más común y abundante. En el total de aislamientos, fueron obtenidos 31 taxa diferentes, siendo las especies generalistas las más comunes en tejidos sanos luego de *Colletotrichum* spp. En las diferentes partes de tejidos fueron obtenidos un total de entre 15 taxa en lámina y 1 sólo taxa en xilema de pedúnculo. Entre los taxa obtenidos, excluyendo *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum purpurascens* fueron las especies más comunes aisladas del cáliz y *Phoma* spp. de corteza de pedúnculo.

Palabras clave: endofitismo; *Colletotrichum*; Uruguay; *Alternaria*; *Cladosporium*; *Phoma*.

## 8. SUMMARY

The main purpose of this research was to examine the endophytic fungal composition of leaf blade, petiole, calyx, floral peduncle bark and xylem and twigs node and internode of *Citrus cinensis*. Plants were located in central west of Uruguay. Segments from each material were surface sterilized and then plated on 2 % potato detrose agar medium. A total of 1150 isolates corresponding to 31 taxa have been obtained from 1600 segments of healthy tissues, ranging from 574 isolates from leaves to 1 isolate from xylem of floral peduncule. The frequency of taxa colonization ranged from 1 taxa in the xylem to 15 in leaf blades. *Colletotrichum*, colonized nearly all tissues and was the most frequent taxa. It was possible to discriminate 8 morphological groups from the total isolates all corresponding to *C. gloeosporioides*, the causal agent of anthracnosis of branches and fruits. This species is a very frequent endophyte of several plants as the other minor taxa found such as *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. *Phoma* spp. and *Epicoccum purpurascens*.

Key words: endophitism; *Colletotrichum*; Uruguay; *Alternaria*; *Cladosporium*; *Phoma*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*. 87: 979-987.
2. ALLEN, E.A.; HOCH, H.C.; STEADMAN, J.R.; STAVELY, R.J. 1991. Influence of leaf surface features on spore deposition and epiphytic growth of phytopathogenic fungi. In: *Microbial ecology of leaves*. J.H. Andrews; S.S. Hirano eds. New York, Springer-Verlag. pp. 87-110.
3. ARX, J. A. VON. 1981. *The Genera of fungi sporulating in pure culture*. 3rd. ed. Berlin, Verlag Von J. Cramer. 315 p.
4. BAILEY, J.A.; O`CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum; biology, pathology and control*. J. A. Bailey; M. J. Jeger eds. Wallingford, UK, CAB International. pp. 88-120.
5. BAXTER, A.P.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A. 1984. A synoptic key to South African isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany*. 3: 265-266.
6. BRUNO, Y.; ERREA, E. 2004. Cítricos; campaña 2004 y perspectivas para el 2005. (en línea). Anuario OPYPA 2004. Consultado abr. 2005. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario04/ARCHIVOS%20PDF/MA-15-CITRICOS%20CAMPA%D1A%202004.pdf>
7. BRYSON, R.J.; CATEN, C.E.; HOLLOMON, D.W.; BAILEY, J.A. 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum; biology, pathology and control*. J. A. Bailey; M. J. Jeger eds. Wallingford, UK, CAB International. pp. 27-46.

8. CARROLL, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves; from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*. 69: 2-9.
9. \_\_\_\_\_. 1991. Beyond pest deterrence-alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants. *In: Microbial ecology of leaves*. J. H. Andrews; S. S. Hirano eds. New York, Springer-Verlag. pp. 358-375.
10. DILLARD, H.R. 1992. *Colletotrichum coccodes*; the pathogen and its hosts. *In: Colletotrichum; biology, pathology and control*. J. A. Bailey; M. J. Jeger eds. Wallingford, UK, CAB International. pp. 225-236.
11. FISHER, P.J.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C. 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia*. 45: 338-345.
12. \_\_\_\_\_.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca, and Switzerland. *New Phytologist*. 127: 133-137.
13. FREEMAN, S.; RODRÍGUEZ, R.J. 1993. Genetic conversión of a fungal pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*. 260: 75-78.
14. \_\_\_\_\_.; KATAN, T.; SHABI, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*. 82: 596-605.
15. \_\_\_\_\_. 2000. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. *In: Colletotrichum; host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. D. Prusky; S. Freeman; M. B. Dickman eds. St. Paul, MN, APS. pp. 131-143.

16. HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. Wallingford, UK, CAB International. 616 p.
17. JOHNSTON, P.R.; JONES, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*. 89: 420-430.
18. KINKEL, L. 1991. Fungal community dynamics. In: Microbial ecology of leaves. J. H. Andrews; S. S. Hirano eds. New York, Springer-Verlag. pp. 253-270.
19. MALLOCH, D.; BLACKWELL, M. 1992. Dispersal of fungal diaspores. In: The fungal community; its organization and role in the ecosystem. G. C. Carroll; D. T. Wicklow eds. New York, Marcel-Dekker. pp. 147-171.
20. MARTINEZ, S. 2000. Hongos endófitos presentes en *Citrus sinensis*. In: Encuentro de Jóvenes Biólogos (2º, 2000, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, Facultad de Ciencias. p. 49.
21. NICHOLSON, R.L. 1992. *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose disease of corn and sorghum. In: *Colletotrichum*; biology, pathology and control. J. A. Bailey; M. J. Jeger eds. Wallingford, UK, CAB International. pp. 186-202.
22. O'CONNELL, R.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J.; GREEN, J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: *Colletotrichum*; host specificity, pathology and host-pathogen interaction. D. Prusky; S. Freeman; M. B. Dickman eds. St. Paul, MN, APS. pp. 57-77.
23. PETRINI, O.; FISHER, P.J. 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research*. 94: 1077-1080.

24. \_\_\_\_\_. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves. J. H. Andrews; S. S. Hirano eds. New York, Springer-Verlag. pp. 179-197.
25. \_\_\_\_\_. 1996. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In: Endophytic fungi in grasses and woody plants; systematics, ecology and evolution. S. C. Redlin; L. M. Carris eds. St. Paul, MN, APS. pp. 87-100.
26. PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R.J.; KEEN, N.T. 1994. A non-pathogenic mutant strain of *Colletotrichum magna* induces resistance to avocado fruits to *C. gloeosporioides*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 7: 326-333.
27. \_\_\_\_\_. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 34: 413-434.
28. ROLLINGER, J. L.; LANGENHEIM, J. H. 1993. Geographic survey of fungal endophyte community composition in leaves of coastal redwood. *Mycologia*. 85: 149-156.
29. SIEBER-CANAVESI, F.; SIEBER, T.N. 1987. Endophytische Pilze in Tanne (*Abies alba* Mill.).- Vergleich zweier Standorte im Schweizer Mittelland (Naturwald-Aufforstung). *Sydowia*. 40: 250-273.
30. SINCLAIR, J.B.; CERKAUSKAS, R.F. 1996. Latent infections vs. endophytic colonization by fungi. In: Endophytic fungi in grasses and woody plants; systematics, ecology and evolution. S.C. Redlin; L.M. Carris eds. St. Paul, MN, APS. pp. 3-29.
31. SIVANESAN, A.; HSIEH, W.H. 1993. A new ascomycete, *Glomerella septospora* sp. nov. and its coelomycete anamorph, *Colletotrichum taiwanense* sp. nov.

from Taiwan. *Mycological Research*. 97: 1523-1529.

32. SMITH, B. J.; BLACK, L.L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*. 74: 69-76.
33. STATSOFT. 1995. STATISTICA for Windows; computer program manual. Tulsa, OK, StatSoft. 110 p.
34. SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, CMI. 696 p.
35. \_\_\_\_\_. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum; biology, pathology and control*. J. A. Bailey; M. J. Jeger eds. Wallingford, UK, CAB International. pp. 1-26.
36. TIMMER, L.W.; BROWN, G.E.; ZITKO, S.E. 1998. The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Disease*. 82: 415-418.
37. \_\_\_\_\_.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. 2000. Compendium of citrus diseases. 2<sup>nd</sup>. ed. St. Paul, MN, APS. 92 p.
38. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERIA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE INVESTIGACIONES ECONOMICAS AGROPECUARIAS. 2002. Anuario estadístico agropecuario 2002. Montevideo, Hemisferio Sur. 217 p.
39. WHITESIDE, J.O. 1993. Symptomless and quiescent infections by fungi. In: *Compendium of citrus diseases*. J. O. Whiteside; S. M. Garnsey; L. W. Timmer eds. 2<sup>nd</sup>. print. St. Paul, MN, APS. p. 30.

40. WILSON, D. 1993. Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos*. 68: 379-384.
41. \_\_\_\_\_.; CARROLL, G.C. 1994. Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia*. 86: 635-647.
42. \_\_\_\_\_. 1996. Manipulation of infection levels of horizontally transmitted fungal endophytes in the field. *Mycological Research*. 100: 827-830.
43. \_\_\_\_\_.; CARROLL, G.C. 1997. Avoidance of high-endophyte space by gall-forming insects. *Ecology*. 78: 2153-2163.
44. \_\_\_\_\_. 2000. Ecology of woody plant endophytes. In: *Microbial endophytes*. C. W. Bacon; J. F. White Jr. eds. New York, Marcel Dekker. pp. 389-420.
45. \_\_\_\_\_.; FAETH, S.H. 2001. Do fungal endophytes result in selection for leafminer ovipositional preference?. *Ecology*. 82: 1097-1111.

## 10. ANEXOS

Matriz de datos utilizada para realizar el análisis de correspondencia de hongos endófitos aislados de partes de tejidos de *Citrus sinensis*, con frecuencia igual o mayor a 5%.

	LÁMINA	PECÍOLO	NODO	ENC	ENX	CÁLIZ	PC
<b>Aal</b>	0,400	1,500	3,500	0,500	0,000	35,000	3,000
<b>Asp</b>	0,000	0,000	0,000	2,500	0,000	0,000	8,000
<b>Csp</b>	2,200	0,500	0,000	0,000	0,000	30,000	3,000
<b>Cg2</b>	96,200	38,000	25,000	18,500	1,500	17,000	1,000
<b>Cg3</b>	1,800	4,500	21,000	0,000	0,000	1,000	0,000
<b>Cg4</b>	0,000	0,000	0,000	6,500	0,000	0,000	0,000
<b>Cg5</b>	5,400	4,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Cg6</b>	0,000	0,500	0,500	1,500	0,000	0,000	0,000
<b>Cg7</b>	3,200	20,500	0,000	16,500	0,000	0,000	0,000
<b>Epp</b>	0,000	0,000	1,500	0,000	0,000	10,000	1,000
<b>Fsp</b>	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	2,000	7,000
<b>Gls</b>	0,000	4,500	6,000	5,000	3,000	0,000	4,000
<b>Psp</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	22,000

**Abreviaciones:** Tejidos; ENC, corteza de entre nudo; ENX, xilema de entre nudo; PC, corteza de pedúnculo; Hongos; Aal, *Alternaria alternata*; Asp, *Alternaria* sp.; Csp, *Cladosporium* sp.; Cg2-7, *Colletotrichum gloeosporioides* 2-7; Epp, *Epicoccum purpurascens*; Fsp, *Fusarium* sp.; GlS, *Glomerella septospora*; Psp, *Phoma* sp.

Matriz de datos utilizada para realizar el análisis de correspondencia de hongos endófitos aislados de órganos de *Citrus sinensis*, con frecuencia igual o mayor a 2%.

	HOJA	RAMA	P. FRUTO
<b>Aal</b>	0,70	1,30	12,70
<b>Asp</b>	0,00	0,80	2,70
<b>Csp</b>	1,70	0,00	11,00
<b>Cac</b>	0,10	0,00	0,00
<b>Cg2</b>	79,60	15,00	6,00
<b>Cg3</b>	2,60	7,00	0,30
<b>Cg4</b>	0,00	2,20	0,00
<b>Cg5</b>	5,10	0,00	0,00
<b>Cg6</b>	0,10	0,70	0,00
<b>Cg7</b>	8,10	5,50	0,00
<b>Epp</b>	0,00	0,50	3,70
<b>Fsp</b>	0,00	0,20	3,00
<b>Gls</b>	1,30	4,70	1,30
<b>Psp</b>	0,00	0,00	7,70

**Abreviaciones:** Órgano; P. Fruto, pedúnculo del fruto; Hongos; Aal, *Alternaria alternata*; Asp, *Alternaria* sp.; Csp, *Cladosporium* sp.; Cac, *Colletotrichum acutatum*; Cg2-7, *Colletotrichum gloeosporioides* 2-7; Epp, *Epicoccum purpurascens*; Fsp, *Fusarium* sp.; GlS, *Glomerella septospora*; Psp, *Phoma* sp.