

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**Comunidades de hongos endófitos de Myrtaceae neotropicales:
evaluación de la producción de enzimas y metabolitos bioactivos**

Susana Tiscornia

Orientador:

Dra. Lina Bettucci

Tribunal:

Q.F. Alicia Arias

Dra. Elena Fabiano

Dra. Sandra Lupo

Dra. Silvana Vero

Diciembre de 2012.

ÍNDICE

	Páginas
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Algunas características biológicas de los hongos	3
1.2 Grupos tróficos y endófitos	5
1.3 Coevolución Planta-Hongo	10
1.4 Clases de hongos endófitos	12
1.5 Comunidades de endófitos: diversidad y distribución geográfica de las especies.	14
1.5.1 Diversidad interespecífica	15
1.5.2 Diversidad intraespecífica	15
1.6 Especificidad o Preferencia	16
1.6.1 Por hospedero	16
1.6.2 Por órganos o tejidos	16
1.7 Relación con el hospedero	17
1.8 Presencia de hongos entomopatógenos como endófitos	20
1.9 Actividad enzimática de los endófitos: producción de enzimas degradadoras de componentes estructurales de la plantas	21
1.10 Actividad metabólica de especies endofitas: producción de metabolitos secundarios	23
1.11 Plantas neotropicales en Uruguay, relevamiento de hongos endófitos	27
1.12 Características de las plantas seleccionadas para el estudio	28
2 HIPÓTESIS	31
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIALES Y MÉTODOS	33

4.1	Descripción del area de estudio	33
4.2	Muestreo	34
4.3	Aislamiento de hongos endófitos	35
4.3.1	Hojas	35
4.3.2	Ramas	35
4.3.3	Desinfección superficial	35
4.3.4	Aislamiento de hongos	36
4.4	Identificación de los hongos aislados	37
4.5	Evaluación de la capacidad degradadora. Producción de enzimas extracelulares	38
4.5.1	Endocelulasas	39
4.5.2	Ligninasas	39
4.5.3	Pectinasas	40
4.6	Evaluación de la producción de metabolitos fitotóxicos	40
4.7	Evaluación de la capacidad antagónica. Producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria frente a bacterias y hongos.	41
4.8	Evaluación de Entomopatogenicidad	43
4.8.1	Evaluación de la capacidad patogénica frente a hormigas	43
4.8.2	Caracterización enzimática: determinación de proteasas y quitinasas	44
4.9	Análisis de los datos	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Ensamblés fúngicos presentes en diferentes órganos y tejidos de <i>Eugenia uruguayensis</i> , <i>Myrcianthes cisplatensis</i> y <i>Myrrhinium atropurpureum</i> .	46
5.2	Evaluación de la actividad degradadora de los endófitos sobre los componentes estructurales de las plantas. Producción de enzimas extracelulares: endocelulasas, pectinasas y ligninasas	57
5.3.	Evaluación de la capacidad de producir metabolitos fitotóxicos.	63
5.4	Evaluación de la capacidad antagónica. Producción de metabolitos secundarios	65
5.5	Evaluación de la capacidad entomopatogénica de endófitos	67

5.5.1	Evaluación de la capacidad entomopatogénica frente a hormigas	67
5.5.2	Caracterización enzimática. Determinación de proteasas y quitinasas	69
6	DISCUSIÓN	70
7	CONCLUSIONES	84
8	PERSPECTIVAS	86
9	BIBLIOGRAFÍA	87
10	ANEXOS	105

TABLAS

Tabla 1.	Criterios utilizados para caracterizar las distintas clases de hongos endófitos.	13
Tabla 2.	Ejemplos de preferencia por hospedero.	16
Tabla 3.	Ejemplos de preferencia por órganos y tejidos.	17
Tabla 4.	Algunos metabolitos producidos por hongos endófitos.	26
Tabla 5.	Hongos endófitos aislados de tres plantas nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae. Frecuencia de colonización en los diferentes tejidos expresada en porcentaje.	48
Tabla 6.	Índice de diversidad de Shannon para órganos y tejidos de <i>E. uruguayensis</i> , <i>M. cisplatensis</i> y <i>M. atropurpureum</i>	52
Tabla 7.	Porcentaje de aislamientos con actividad enzimática celulolítica, pectinolítica y lignolítica según la especie de planta hospedera	58
Tabla 8.	Evaluación de la producción de enzimas extracelulares por los endófitos de <i>E. uruguayensis</i>	60
Tabla 9.	Evaluación de la producción de enzimas extracelulares por los endófitos de <i>M. cisplatensis</i>	61
Tabla 10.	Evaluación de la producción de enzimas extracelulares por los endófitos de <i>M. atropurpureum</i>	62

Tabla 11. Evaluación de fitotoxicidad de los extractos obtenidos a partir de los hongos endófitos sobre hojas de <i>E. uruguayensis</i>	64
Tabla 12. Medidas de los halos de inhibición del crecimiento microbiano (mm) producidos por los metabolitos fúngicos extraídos y toxicidad de los mismos sobre <i>Artemia salina</i>	66
Tabla 13. Actividad enzimática proteolítica y quitinolítica de <i>M. anisopliae</i>	69

FIGURAS

Figura 1. Factores que afectan la interacción planta-hongo	9
Figura 2. Comparación de árboles genealógicos de órdenes de Ascomycetes endófitos y las familias de plantas hospedadoras	11
Figura 3. Variación de la <u>riqueza</u> y <u>diversidad</u> de hongos endófitos desde los bosques boreales a los trópicos	15
Figura 4. Número acumulado de patentes estadounidenses otorgadas en hongos endófitos productores de metabolitos importantes y que presentan una actividad de importancia biológica	25
Figura 5. <i>Myrrhimum atropurpureum</i> , hojas, flores, frutos y detalle de rama	29
Figura 6. <i>Myrcianthes cisplatensis</i> , hojas y detalle de tronco	29
Figura 7. <i>Eugenia uruguayensis</i> , hojas y detalle de tronco	30
Figura 8. Sitios de muestreo	33
Figura 9. Discos de hojas y segmentos de pecíolos sembrados en cajas de Petri conteniendo medio agar-malta con cloranfenicol	36
Figura 10. Colonias de hongos emergiendo de segmentos de hojas, pecíolos y ramas	37
Figura 11. Gel de agarosa donde se observan las bandas de ADN amplificado (secuencias ITS), de diferentes aislamientos de endófitos	38
Figura 12. Curvas de acumulación de especies	47

Figura 13. Ajuste al modelo de distribución log-normal (Kolmogorov-Smirnov) de la abundancia de especies para cada órgano en las tres plantas nativas	50
Figura 14. Porcentaje de segmentos de tejidos colonizados en <i>M. atropurpureum</i> , <i>M. cisplatensis</i> y <i>E. uruguayensis</i>	51
Figura 15. Diversidad en las tres plantas estudiadas	52
Figura 16. Análisis de Correspondencias construido para las tres especies de plantas	55
Figura 17. Análisis de Correspondencias con Órganos (Hoja y Rama) de las tres Especies de Plantas. (Ejes 1 y 2)	55
Figura 18. Análisis de Correspondencias con Órganos (Hoja y Rama) de las tres Especies de Plantas (Ejes 1 y 3)	56
Figura 19. Análisis de Correspondencias con Tejidos, Órganos y Especies de Plantas	56
Figura 20. Producción de endocelulasas. Formación de halo de clareado	57
Figura 21. Producción de pectinasas. Formación de halo de clareado	57
Figura 22. Producción de ligninasas. Escala de clareado utilizada para la evaluación (+, ++, +++, +++++)	58
Figura 23. Efecto de los metabolitos sobre las hojas de <i>E. uruguayensis</i>	63
Figura 24. <i>Lophiostoma</i> sp. (aislamiento 246)	65
Figura 25. <i>Metarhizium anisopliae</i> (aislamiento 238)	68
Figura 26. Mortalidad de hormigas <i>A. lundii</i> provocada por la inoculación con <i>M. anisopliae</i> .	68
Figura 27. Emergencia de micelio de <i>M. anisopliae</i> en hormigas muertas	68
Figura 28. Se observan halos de clareado alrededor del micelio de <i>M. anisopliae</i> , indicando actividad enzimática para proteasas (A) y para quitinasas (B)	69

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Lina Bettucci por guiarme en todas las instancias de la tesis, por la experiencia y los conocimientos transmitidos, por confiar en mí y apoyarme permanentemente.

Expreso mi sincero agradecimiento a los miembros del tribunal: Q.F. Alicia Arias, Dra. Elena Fabiano, Dra. Sandra Lupo y Dra. Silvana Vero, que aceptaron evaluar esta tesis, cuyos aportes y correcciones permitirán mejorar la calidad de este trabajo.

Agradezco también a todos mis compañeros del Laboratorio de Micología: Raquel, Dinorah, Eduardo, Anita, Lucía, Sebastián S., Sebastián M., Sandra, Natalia, Fernando, Agustina, Carlos, Luis, Mariela, Silvina, César, y en particular a mis chiquis Belén y Rafael por su permanente ayuda y a Umberto por los intercambios académicos cada mañana complicada.

Por otra parte quiero agradecer al Lic. César Fagundez, por su asesoramiento para la identificación de las plantas y facilitarme los registros de las mismas para seleccionar los sitios de muestreo.

Agradezco mucho a quienes proporcionaron las cepas de microorganismos para realizar los ensayos de antagonismo:

A la Dra. Matilde Soubes de la Facultad de Química, por proporcionar las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

A la Dra. Inés Ponce del Instituto Clemente Estable por proporcionar la cepa de *Erwinia carotovora*.

A la Dra. Mercedes Peyrou del Instituto Clemente Estable por proporcionar la cepa de *Xanthomonas axonopodis* patovar *citri*.

Al Dr. Andrés Puime del Ministerio de Salud Pública por proporcionar la cepa de *Candida albicans*.

Finalmente quiero agradecer a toda mi familia por el permanente apoyo y el afecto brindado durante todo el desarrollo de la tesis.

Muchas Gracias!!!!!!

RESUMEN

Las plantas forman asociaciones simbióticas con hongos que viven, en forma quiescente, dentro de los tejidos sanos del hospedante, estos hongos se denominan endófitos. El término, que proviene del siglo XIX, ha evolucionado notablemente, a medida que se fueron teniendo en cuenta las asociaciones con distintas partes de las plantas y las modalidades de asociación con sus hospederos (Carroll 1986; 1988). Las interacciones entre los hongos endófitos y la planta hospedera pueden variar desde mutualistas a patógenos latentes que sólo producen síntomas cuando las condiciones ecológicas y fisiológicas favorecen su virulencia. Se ha demostrado que aislamientos de especies endofitas poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios con varios tipos de bioactividad tales como antifúngicos, antibióticos, antivirales, antioxidantes entre otros. El propósito de este trabajo fue el aislamiento, identificación y caracterización de los endófitos presentes en plantas nativas *Myrrhinium atropurpureum* (palo de hierro), *Myrcianthes cisplatensis* (guayabo colorado) y *Eugenia uruguayensis* (guayabo blanco) ampliamente distribuídas en nuestro país. Además se evaluaron las diferentes funciones que pueden cumplir los hongos endófitos, como degradadores de biomasa vegetal, como potenciales patógenos de plantas e insectos, y también como antagonistas microbianos capaces de producir metabolitos de interés como antibióticos o antifúngicos de baja toxicidad. Los resultados mostraron que las especies de hongos aisladas con mayor frecuencia pertenecen al grupo Ascomycetes y son endófitos típicos que ya han sido aislados de numerosas plantas, incluso de otras Myrtaceae nativas (*Acca sellowiana*, *Blepharocalyx salicifolius* y *Myrceugenia glaucescens*). Se observaron diferencias en los ensambles fúngicos de las tres especies de plantas estudiadas, separándose fundamentalmente la comunidad endofítica de *E. uruguayensis*. Por el contrario, los órganos y tejidos no tuvieron un efecto significativo sobre la composición de la comunidad de endófitos, excepto en *M. atropurpureun* donde se observó diferencia en la composición de la comunidad endofítica de hojas y ramas. La mayoría de los aislamientos endofíticos presentaron una buena

capacidad degradadora de los componentes estructurales de los vegetales, confirmando que los hongos endófitos son capaces de pasar a un estilo de vida saprofitica. Muy pocos aislamientos podrían ser considerados patógenos latentes en base a la capacidad de producir metabolitos fitotóxicos y pectinasas, destacándose los aislamientos *Nigrospora sphaerica* 113 y *Xylaria* sp. 120. Algunos otros pertenecen al género *Phomopsis* y fueron aislados principalmente de *E. uruguayensis*. Este aspecto es importante considerando que algunas plantas nativas podrían ser un reservorio de patógenos que pudieran afectar a las plantaciones forestales de Myrtaceae. Se encontraron especies fúngicas capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana frente a patógenos, y a su vez con toxicidad leve o no tóxicos, confirmando que los hongos endófitos de las Myrtaceae nativas pueden ser una fuente de metabolitos secundarios con algún tipo de bioactividad. *Metarhizium anisopliae*, hongo entomopatógeno endófito en xilema de *E. uruguayensis* presentó una buena capacidad para infectar y matar hormigas. Este organismo es comúnmente utilizado para el control biológico de insectos plaga. La presencia de especies con capacidad antagónica frente a microorganismos y de entomopatógenos dentro de la comunidad de hongos endófitos, es importante para la selección de cepas antagonistas aplicables en el control biológico de enfermedades y plagas.

Es necesario continuar con el estudio de los hongos endófitos en más especies de plantas nativas, para poder determinar si realmente existe preferencia de los hongos por: especies de plantas, órganos o tejidos y concluir con mayor profundidad sobre la función ecológica de los endófitos.

Es necesario también profundizar en el estudio de los metabolitos e identificar cuales son los compuestos con bioactividad presentes en los extractos fúngicos. También es importante continuar con la evaluación de la capacidad entomopatógena de la cepa de *M. anisopliae* frente a otros insectos considerados plaga.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Algunas características biológicas de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas cuyas formas vegetativas son extremadamente diversas yendo desde las más simples formadas por una sola célula como las levaduras a estructuras filamentosas mucho más complejas y diferenciadas. En cuanto a su modo de nutrición, son organismos heterótrofos y obtienen los nutrientes por absorción. Se reproducen sexual o asexualmente por medio de esporas. La unidad estructural de los hongos es la hifa, una estructura filamentosa cilíndrica cuyo crecimiento es estrictamente apical, proliferando a través del sustrato en forma penetrante e invasiva. El protoplasma fúngico está rodeado de una pared celular externa compuesta por quitina y glucanos; la pared fúngica le da forma a la hifa, provee protección osmótica y física, influye sobre el flujo de materiales y regula su incorporación hacia el interior de la célula (permeabilidad selectiva). Junto con la membrana plasmática y el espacio periplásmico funciona en el reconocimiento célula-célula no solamente en las interacciones entre hongos sino también entre hongo y plantas o animales potencialmente simbiotes; es una interfase activa entre el organismo y el medio externo (Steinberg 2007). Puede contener proteínas adhesivas que permiten la unión de las hifas formando estructuras macroscópicas complejas, por ej. rizomorfos o cordones micelianos. La pared puede ser hialina o contener pigmentos como la melanina que le dan protección a la hifa frente a las radiaciones UV. El desarrollo de la pared en los hongos es una condición crítica para su crecimiento y sobrevivencia en distintos medios. Las hifas pueden estar más o menos ramificadas y pueden presentar septos, producidos a intervalos más o menos regulares delimitando compartimentos que no son estancos puesto que los poros presentes en los septos permiten el pasaje de citoplasma y organelos manteniendo una continuidad en el protoplasma fúngico. La complejidad de los poros depende del grupo de hongos. Los nutrientes se pueden relocalizar desplazándose en direcciones opuestas. En las partes más viejas los septos están

obturados aislando las partes senescentes o en vía de degeneración, de las partes activas. El conjunto de hifas que forma el talo fúngico se denomina micelio y su estructura y organización característica hace que estos organismos puedan explotar un amplio rango de habitats en forma exitosa. La colonización del sustrato ocurre por la extensión y ramificación radial de las hifas que provienen de la germinación de una espora. Dado que el crecimiento hifal tiene lugar en el ápice, las porciones terminales son, en consecuencia, donde se efectúan las actividades esenciales de síntesis. La porción apical se caracteriza por la presencia de numerosas vesículas citoplasmáticas que contienen las enzimas y los precursores de la síntesis de nuevos biopolímeros. El citoesqueleto de los hongos está distribuido fundamentalmente en forma longitudinal a lo largo de la hifa y juega un papel importante en el crecimiento hifal y en el transporte de organelos. La estrecha asociación de los microtúbulos con vesículas sugiere que funcionan como un sistema de transporte que las moviliza hacia los ápices hifales.

Los microfilamentos de actina, asociados con la membrana plasmática apical, participarían también en el proceso de crecimiento. El Spitzenkörper es una estructura compleja dominada por microvesículas organizadas alrededor de un centro formado por una red de microfilamentos, contiene también ribosomas, microtúbulos y filamentos (vesículas asociadas con material filamentoso). Es un centro organizador de vesículas relacionado con la morfogénesis hifal. Las vesículas almacenadas en el Spitzenkörper determinan el crecimiento hifal por exocitosis controlada. Las fuerzas citoplasmáticas que se pueden generar por presión de turgor y la dinámica del citoesqueleto empuja al ápice flexible hacia delante (Steinberg 2007).

En las porciones más viejas, pero aun activas del micelio, es donde se producen los metabolitos secundarios tales como antibióticos y micotoxinas.

1.2. Grupos tróficos y endófitos

Los hongos pueden desarrollarse en todos los hábitat donde exista materia orgánica formando grupos ecológicos diferentes pero solapados, asociados con varios recursos. De acuerdo al comportamiento nutricional los hongos cumplen distintos roles en el ecosistema: los saprótrofos se desarrollan sobre materia orgánica muerta, son los principales descomponedores de los componentes estructurales de las plantas y muy importantes en el reciclaje de nutrientes. Otros se especializan en atacar e infectar organismos vivos tales como los necrótrofos que pueden infectar el huésped ocasionando la muerte de las células mediante la producción de toxinas nutriéndose luego saprotróficamente y provocan podredumbres blandas y canchales. Los biótrofos se desarrollan en íntimo contacto con células vivas de un hospedante, pueden ser simbioses mutualistas (micorrizas, líquenes), parásitos (provocando daño al hospedante), pueden ser epífitos (colonizan la superficie de los órganos vegetales) o endófitos, es decir que colonizan los tejidos vivos internos de plantas sin causarles ningún efecto negativo inmediato (Isaac 1992).

Las asociaciones simbióticas entre hongos y organismos fotosintetizadores son muy antiguas y ubicuas, comprendiendo interacciones que van desde el mutualismo hasta el antagonismo, la mayoría de las investigaciones han estado enfocadas hacia los hongos patógenos de plantas y a los simbioses de la rizosfera tales como los hongos micorrízicos. En contraste, la diversidad y composición de especies, la relevancia ecológica y la importancia evolutiva de los diversos y abundantes hongos que existen en la filosfera no han sido establecidas para la mayoría de las asociaciones planta-hongo (Arnold & Lewis 2005).

El término endófito se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar aquellos hongos que viven dentro de las plantas (Léveillé 1846; de Bary 1866). El significado de este término ha variado acorde con el avance del conocimiento en este campo. Carroll (1986) los define como organismos que viven asintóticamente dentro de tejidos aéreos vegetales vivos, excluyendo los hongos patógenos y las micorrizas. Sin embargo, el término puede agrupar tanto

hongos saprófitos como hongos patógenos latentes los cuales pueden producir síntomas sobre su hospedero cuando el tejido en el que habitan se debilita o se torna senescente (Petrini 1991).

Wilson (1995) considera a los organismos endófitos como hongos o bacterias que durante parte o todo su ciclo de vida invaden tejidos vegetales vivos y causan infecciones asintomáticas completamente dentro del tejido vegetal; esto excluye las asociaciones micorrizicas e incluye hongos con fases latentes antes del período de infección y hongos que son patógenos conocidos pero que no expresan síntoma en los tejidos. El término podría extenderse para incluir otros grupos tales como protozoarios y nemátodos que viven dentro de los tejidos vegetales siempre y cuando sean asintomáticos (Gamboa y Bayman 2001). Stone *et al.*(2000) los definen como microbios que colonizan los tejidos vivos internos de plantas sin causarles ningún efecto negativo inmediato pudiendo ocupar miles de nichos únicos (plantas) que crecen en distintos ambientes (Strobel *et al.* 2005). Las bacterias y los hongos son los microorganismos mas comúnmente encontrados como endófitos siendo los hongos los más frecuentes.

Algunos micólogos comenzaron a emplear el término endófito sólo para referirse a aquellos hongos que colonizan una planta sin causar síntomas visibles de enfermedad en un momento específico (Petrini 1991, Wilson 1995, Stone *et al.* 2000), es decir, el término se refiere únicamente al estado del hongo en el momento de la detección sin atender el estado futuro de la interacción (Schulz & Boyle 2005). Otros autores (Mostert *et al.* 2000) se refieren como "endófitos verdaderos" a aquéllos cuya colonización "nunca" resulta en síntomas visibles de enfermedad.

Todas las plantas terrestres pueden ser hospederos de al menos un hongo endófito (Petrini 1986; Rodrigues 1996), inclusive se han aislado endófitos de plantas acuáticas (Stone *et al.* 2000). Cualquier órgano de la planta puede ser colonizado y las interacciones con la planta hospedera pueden variar desde mutualistas (Redman *et al.* 2002) a comensales crípticos (Deckert *et al.* 2001) o a virulentos patógenos latentes (Schulz *et al.* 1998).

Brundrett (2004) distingue las interacciones micorrízicas de las endofíticas debido a que las micorrizas presentan una alta sincronización entre la planta y el desarrollo del hongo y la transferencia de nutrientes ocurre en interfaces especializadas.

Los hongos endófitos históricamente se han separado en dos grandes grupos: los endófitos de gramíneas (Clavicipitaceos) y los endófitos de otras plantas (No clavicipitaceos).

Los endófitos de gramíneas forman un grupo de organismos fuertemente relacionados, con adaptaciones y requerimientos ecológicos diferentes de los otros grupos de endófitos (Petrini 1996). Estos pertenecen a los géneros de Ascomycetes, *Epichloe* y *Balansia* y sus anamorfos *Neotyphodium* y *Ephelis* respectivamente. Debido a su impacto ecológico y económico, éstas son las interacciones endofíticas mejor estudiadas. Los hongos endófitos de las gramíneas crecen sistémicamente, raramente en forma epicuticular o intracelularmente dentro de todos los órganos de las partes aéreas y las semillas, resultando en una transmisión vertical del endófito por medio de las semillas.

Estos hongos producen un grupo muy diverso de metabolitos secundarios entre ellos alcaloides tóxicos para insectos tales como peramina y lolina, y alcaloides tóxicos para vertebrados como lolitrem B y ergovalina (Schardl 2001). Si bien la mayoría de los metabolitos son de origen fúngico existe evidencia de la interacción biosintética hongo-planta.

Los beneficios primarios de esta relación son para el hongo de tipo nutricional y de protección contra el stress abiótico por ejemplo la desecación (Bacon & Hill 1996) y también frente a la competencia con los organismos epifitos (White *et al.* 2000). Mientras que la ventaja de la interacción para la planta es la protección contra la herbivoría debido a la producción de alcaloides tóxicos. Además los endófitos pueden activar la defensa del hospedero provocando resistencia inducida (Bultman & Murphy 2000).

Los endófitos de otras plantas en contraste con los endófitos de gramíneas son diversos, tanto filogenéticamente como en sus estrategias de vida. La mayoría de esos hongos pertenecen a los Ascomycetes y han sido aislados de todos los

órganos de casi todas las plantas estudiadas (Petrini 1991, Schulz *et al.* 1993, Stone *et al.* 2000). Los hongos pueden infectar por medio de estructuras especializadas como apresorios y haustorios como lo hace *Discula umbrinella* (Berk. & Broome) M. Morelet, (Stone *et al.* 1994), penetrar directamente a través de la pared celular como *Rhabdocline parkeri* Sherwood, J.K. Stone & G.C. Carroll (Stone 1987), o entrar por los estomas y cámara subestomática como *Phaeosphaeria junicola* (Rehm) L. Holm. (Cabral *et al.* 1993). La colonización puede ser inter o intracelular, localizada o sistémica. En este grupo de endófitos se encuentran hongos capaces de ocupar en forma críptica los tejidos de plantas y no ser agresivos, no causando enfermedad, pueden ser patógenos latentes o mutualistas. La transmisión de estos hongos endófitos se da mediante la dispersión de esporas, también conocida como transmisión horizontal, que ocurre en la mayoría de los casos predominando en plantas leñosas (Carroll 1990). El estado de la interacción entre el hongo endófito y el hospedero es transitorio y la estabilidad o la variabilidad de la interacción asintomática depende de numerosos factores como el estado de desarrollo de la planta hospedera (tejidos jóvenes o senescentes), de las características del hongo (virulencia) y de la respuesta defensiva de la planta. Estas interacciones dependen de los factores ambientales que influyen sobre la plasticidad fenotípica de ambos, es decir, sobre la variación intra-individuo, bajo la doble influencia de los genes y el ambiente (West-Eberhard 2003), haciendo que el comportamiento de los endófitos sea flexible y tengan varias opciones: infección, latencia, colonización local, virulencia y saprofitismo. Por lo tanto la interacción planta-hongo endófito depende de un “balance de antagonismos” (Schulz & Boyle 2005), donde hay al menos un grado de virulencia por parte del hongo, que hace posible la colonización y el acceso a los nutrientes, y una respuesta defensiva de la planta limitando la colonización fúngica tal como aparece en el esquema siguiente (Figura 1).

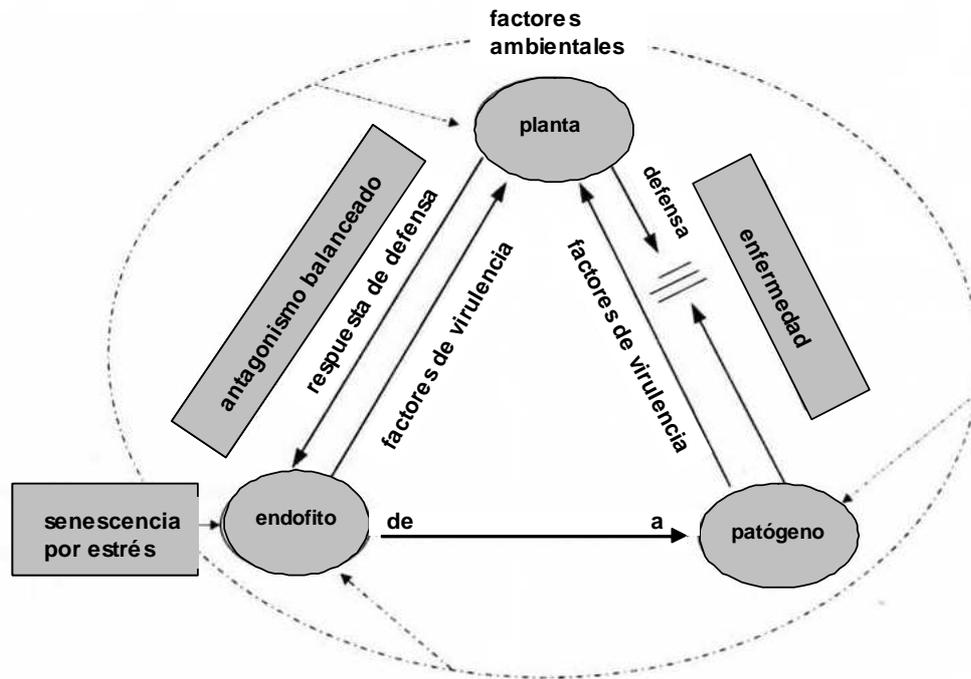


Figura 1. Factores que afectan la interacción planta-hongo (Tomado de Schulz & Boyle 2005)

La interacción entre endófito-hospedero puede considerarse de “antagonismo balanceado” y no excluye la posibilidad de que el endófito pueda tener una función benéfica en su hospedero, por ejemplo, mediante la inducción de metabolitos de defensa potencialmente activos frente a patógenos, por la secreción de fitohormonas, o mediante el incremento de la actividad metabólica de la planta.

Algunos endófitos se muestran como los “Maestros en Plasticidad Fenotípica”, pudiendo infectar como un **patógeno**, colonizar crípticamente los tejidos como **endófito** en forma neutra o mutualista y finalmente desarrollarse y esporular como **saprófito**.

Estudios realizados, que van desde la genómica comparativa a la genética molecular y a la biología celular, indican que hay una superposición considerable entre los grupos de hongos saprótrofos y patógenos pero las diferencias esenciales, que son requisitos para la virulencia de los hongos fitopatógenos, permanece elusiva (Dickman 2007).

1.3. Coevolución Planta-Hongo

El registro fósil indica que las plantas han estado asociadas con hongos endófitos y micorrízicos hace más de 400 millones de años, período en que las plantas colonizaron la tierra, teniendo un papel importante en el pasaje evolutivo del agua a la tierra (Rodríguez *et al.* 2009).

La divergencia entre angiospermas y gimnospermas se estima que ocurrió hace 300 Ma según datos moleculares (Schneider *et al.* 2004). Los Ascomycetes: Diaportales y Helotiales se estima que divergieron en el mismo momento (Berbee & Taylor 2001; James *et al.* 2006) (Figura 2). A partir de allí, los hongos en las coníferas (gimnospermas) evolucionaron a los Helotiales y en las angiospermas a los Diaportales. Es decir, los hongos dominantes han coevolucionado con sus hospederos por más de 300 Ma.

Los Ascomycetes bitunicados (Dothideales, Pleosporales y Mycosphaerellales), y las Xylariales, pueden estar presentes como endófitos dominantes en ambas, angiospermas y gimnospermas. Los Ascomycetes “bitunicados” probablemente divergieron hace más de 300 Ma a partir de un antecesor común a los Helotiales y Diaporthales, consecuentemente antes de la divergencia de gimnospermas y angiospermas siendo ésta una posible razón de la ocurrencia de Ascomycetes bitunicados como endófitos dominantes en ambos grupos de plantas (Sieber 2007).

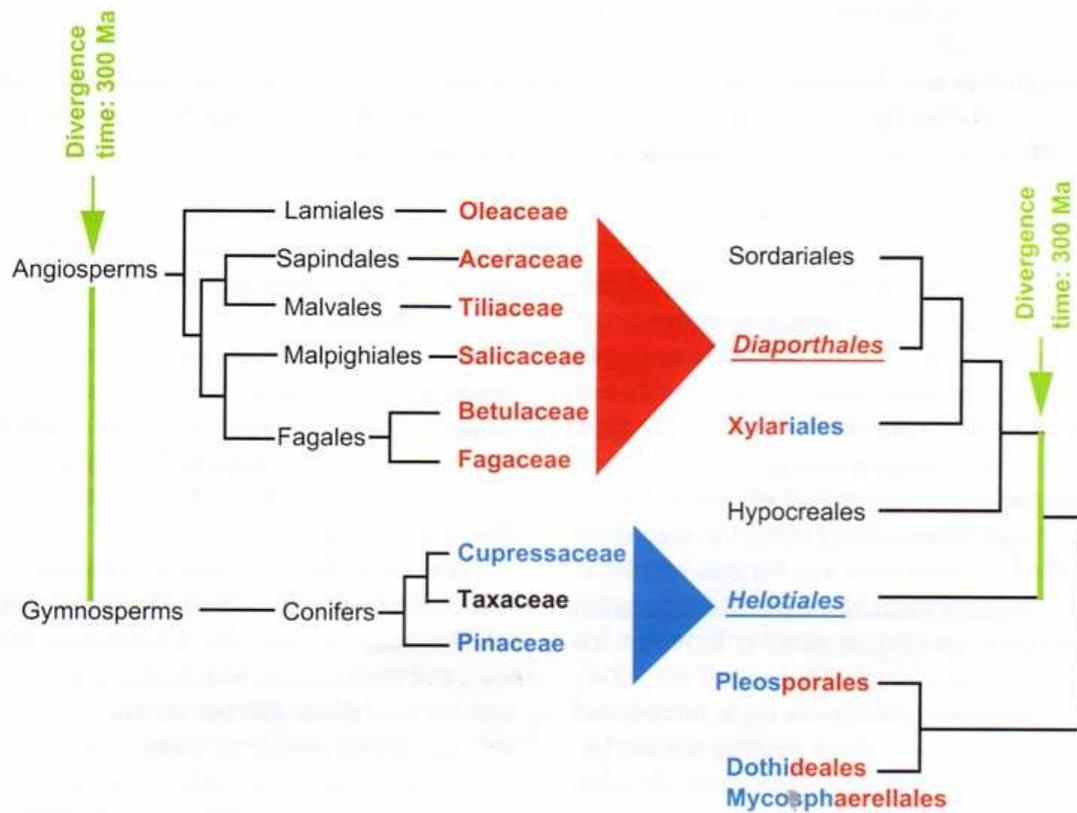


Figura 2. Comparación de árboles genealógicos de órdenes de Ascomycetes endófitos y las familias de plantas hospedadas. Se Indica la coincidencia entre la divergencia de Gimnospermas y Angiospermas y la divergencia de Diaporthales y Helotiales. Tomado de Sieber 2007.

1.4. Clases de hongos endófitos

Los hongos endófitos fueron clasificados en cuatro clases por Rodríguez *et al.* (2009); tomando en cuenta el rango de hospederos, los tejidos colonizados, el tipo de colonización en la planta, la biodiversidad, el tipo de transmisión y los beneficios que le otorgan a la planta (Tabla 1).

Clase 1: ocurren típicamente dentro de los tallos de gramíneas donde producen infecciones sistémicas intercelulares (Bischoff & White 2005; Rodríguez *et al.* 2008). Muchos de ellos otorgan a sus huéspedes resistencia frente a la herbivoría por parte de insectos y mamíferos (Clay 1990; White 1987), así como también mecanismos que permiten tolerar distintos tipos de estrés tanto abióticos como bióticos (Arechavaleta *et al.* 1989; Malinowski & Belesky 2000). Presentan transmisión vertical, pasando de una generación a la siguiente a través de las semillas.

Clase 2: comprende especies pertenecientes fundamentalmente a Ascomycetes y unos pocos representantes de Basidiomycetes. Colonizan raíces, tallos y hojas a través de estructuras de infección como apresorios y forman infecciones intercelulares extensivas. Se caracterizan por su rápida emergencia y esporulación durante la senescencia del huésped. Algunos confieren tolerancia a ciertos tipos de estrés biótico y abiótico (Arnold *et al.* 2003) y adaptaciones al hábitat (Rodríguez *et al.* 2008). La transmisión ocurre por esporas (transmisión horizontal) y vía tegumentos de semillas y/o rizomas (transmisión vertical).

Clase 3: se encuentran en tejidos aéreos, presentan transmisión horizontal (no manifestando vertical), forman infecciones localizadas, son capaces de conferir beneficios o costos y tienen alta biodiversidad en las plantas (Rodríguez *et al.* 2008). Incluye a los hongos asociados a hojas de árboles tropicales (Arnold *et al.* 2000), como también aquellos asociados a plantas no vasculares, plantas vasculares sin semillas, coníferas y angiospermas tanto leñosas como herbáceas. Estos además de ser encontrados en tejidos vegetativos, son encontrados en tejidos reproductivos (flor y fruto) (Barengo *et al.* 2000), siendo raramente hallados en semillas (Arnold *et al.* 2003). Al igual que la clase 2, la mayoría de los

miembros de la clase 3 pertenecen a los Dikaryomycota, con una mayor concentración de Ascomycetes y pocos Basidiomycetes.

Clase 4: presentan dos características fundamentales: son micelios septados oscuros, melanizados y están restringidos únicamente a las raíces de las plantas (Rodríguez *et al.* 2008). Comprende fundamentalmente hongos Ascomycetes conidiales o estériles que forman estructuras melanizadas como hifas inter e intracelulares y también microesclerocios en raíces. La transmisión es primordialmente horizontal (Jumpponen & Trappe 1998).

Tabla 1. Criterios utilizados para caracterizar las distintas clases de hongos endófitos. Tomado y modificado de Rodríguez *et al.* 2009

Criterio	Clavicipitaceos	No clavicipitaceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Rango de hospederos	estrecho	amplio	amplio	amplio
Tejidos colonizados	vástago y rizoma	vástago, raíz y rizoma	vástago	raíz
Colonización en planta	extensiva	extensiva	limitada	extensiva
Biodiversidad en planta	baja	baja	alta	desconocida
Transmisión	vertical y horizontal	vertical y horizontal	horizontal	horizontal
Beneficios	NHA	NHA y HA	NHA	NHA

NHA= *No adaptación al hábitat.* Producen beneficios tales como tolerancia a sequía y aumento de crecimiento.

HA= *Adaptación de hábitat.* Producen beneficios resultantes de presiones selectivas del hábitat. Ej.: pH, temperatura y salinidad.

1.5. Comunidades de endófitos: diversidad y distribución geográfica de las especies.

Colectivamente, más de 100 años de investigación sugieren que la mayoría, sino todas las plantas en ecosistemas naturales son simbióticas con hongos micorrízicos y/o hongos endófitos (Petrini 1986).

Existen alrededor de 300 000 especies de plantas y cada una de ellas puede ser hospedero potencial de uno o más hongos endófitos (Strobel *et al.* 2004). La mayor parte de ellos no han sido estudiados y por lo tanto es posible, en la medida que se continúe con la bioprospección de endófitos, encontrar nuevas especies o cepas de interés. Solo alrededor de 100 000 especies de endófitos han sido descritas (Hawksworth & Rossman 1987) aunque es probable, como han calculado Dreyfuss & Chapela (1994) que existan alrededor de 1 millón de especies de hongos endófitos, por lo que parecería esperable que los endófitos constituyeran una fuente rica y destacable de diversidad genética (Strobel *et al.* 2004).

La diversidad de especies de los hongos endófitos clase 3 es usualmente alta, aún dentro de pequeños volúmenes de tejido.

Se ha visto que la composición de especies endófitas es muy diferente entre las zonas templadas y el trópico (Rodrigues y Petrini 1997). Uno de los taxa endófitos más comunes en los trópicos corresponde a la familia *Xylariaceae*, grupo que también es común en las zonas templadas (Petrini *et al.* 1995) pero como descomponedores de madera y no como endófitos. Además se ha observado que la latitud es significativamente determinante de la frecuencia de infección de hongos endófitos foliares y que existe un gradiente latitudinal tanto en las infecciones endofíticas, donde la incidencia de infecciones decrece linealmente desde los trópicos al ártico; como en la diversidad de endófitos la cual decrece linealmente desde los trópicos hacia los bosques boreales (Arnold & Lutzoni 2007) (Figura 3).

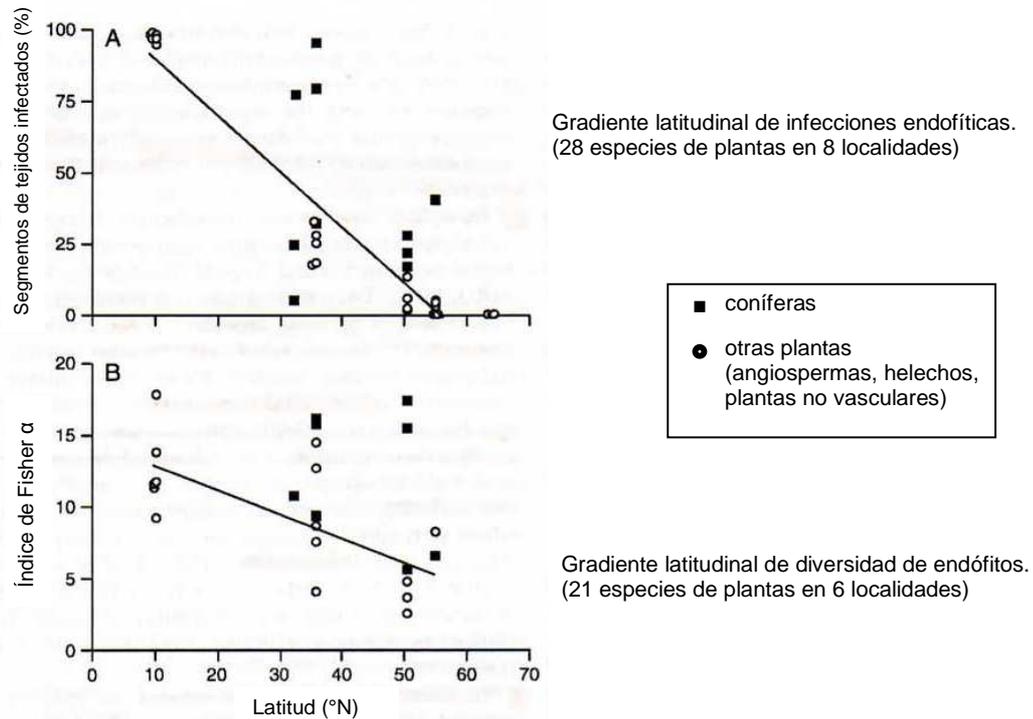


Figura 3. Variación de la riqueza y diversidad de hongos endófitos desde los bosques boreales a los trópicos. Tomado de Arnold & Lutzoni 2007

1.5.1. Diversidad interespecífica

Se han aislado más de 120 especies de hongos endófitos en ramas de *Carpinus caroliniana* Walter y acículas de *Abies alba* Mill. (Bills & Polishook 1991; Sieber - Canavesi & Sieber 1993)

En bosques tropicales húmedos, más de 17 especies de endófitos han sido aisladas de una hoja en segmentos de tejidos de 2 mm² (Gamboa & Bayman 2001) y se detectaron más de 6 especies en fragmentos de 1,5 cm² de corteza de tallos de plantas de castaño de 2 años de edad (Bissegger & Sieber 1994). Carrol (1995) encontró más de 4 especies diferentes por acícula de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.

1.5.2. Diversidad intraespecífica

No sólo la diversidad entre especies, sino también la diversidad intraespecífica (ej. diversidad genotípica), en pequeños volúmenes de tejidos de plantas, puede ser

alta. Por ejemplo, se han encontrado varios genotipos diferentes de *Lophodermium piceae* (Fuckel) Höhn. en acículas de *Picea abies* (L.) Karst. (Müller *et al.* 2001).

1.6. Especificidad o Preferencia

1.6.1. Por hospedero

El término especificidad debe ser reservado para organismos que sólo se desarrollan en un hospedero. Si no es este el caso se habla de preferencia por hospedero (Carrol 1999).

Cuando existe preferencia por hospedero, la tasa de infección es considerablemente mayor en las plantas hospederas que en las que no lo son. Cuando las esporas del endófito se exponen a extractos de tejidos de plantas hospedantes, éstos inducen su germinación, no siendo así con extractos de otras plantas (Petrini 1996).

La adaptación estaría en las primeras etapas de la interacción: reconocimiento del hospedero y germinación (Schulz & Boyle 2005).

En la tabla 2 se muestran ejemplos de preferencia por hospedero.

Tabla 2. Ejemplos de preferencia por hospedero

Taxa	Planta	Referencia bibliográfica
<i>Lophodermium</i> spp. Chevall.	Coníferas	Deckert <i>et al.</i> (2001)
<i>Discula umbrinella</i> (Berk. & Broome) M. Morelet	<i>Fagus sylvatica</i> L.	Sieber & Hugentobler (1987)
<i>Physalospora vaccinii</i> (Shear) Arx & E. Müll.	<i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	Schulz <i>et al.</i> (1993)

1.6.2. Por órganos o tejidos

Tanto en zonas tropicales como templadas, la existencia de especificidad o preferencia de los hongos endofíticos por determinados tejidos en particular

permitiría una mejor repartición del recurso disponible, disminuyendo así la competencia entre los endófitos (Gamboa y Gaitán 2006).

La tabla 3 muestra algunos casos de preferencia.

Tabla 3. Ejemplos de preferencia por órganos y tejidos

Taxa	Órganos y tejidos	Planta	Referencia bibliográfica
<i>Phyllosticta multicorniculata</i> Bissett & M.E. Palm	Acículas	<i>Abies balsamea</i> L. Mill.	(Petrini 1996)
<i>Cenangium ferruginosum</i> Fr. <i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad.) Chevall.	Extremos de las acículas	<i>Pinus uncinata</i> Ramond ex DC. in Lam. & DC	(Sieber <i>et al.</i> 1999)
<i>Cyclaneusma minus</i> (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter	Segmentos medios de acículas	<i>Pinus uncinata</i>	(Sieber <i>et al.</i> 1999)
<i>Melaconium apiocarpum</i> Link <i>Cryptosporiopsis</i> sp. Bubák & Kabát	Corteza de ramas	<i>Alnus</i> spp. Miller	(Fisher & Petrini 1990)
<i>Pestalotiopsis cruenta</i> (Syd.) Steyaert <i>Phomopsis</i> spp. (Sacc.) Bubák	Corteza y xilema de ramitas	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.	(Kumar & Hyde 2004)
<i>Phialocephala fortinii</i> C.J.K. Wang & H.E. Wilcox, <i>Phialophora</i> spp. Medlar, <i>Cryptosporiopsis radicularis</i> Kowalski & C. Bartnik	Raíz	<i>Quercus</i> spp. L.	(Jumpponen & Trappe 1998) (Kowalski & Bartnik 1995)

1.7. Relación con el hospedero

En términos generales, si bien los hongos endófitos forman con sus hospederos relaciones simbióticas complejas donde los costos y beneficios son poco conocidos, en la mayoría de las plantas la presencia de hongos endófitos es beneficiosa. Redman *et al.* (2002) demostraron que los endófitos aumentan la tolerancia a la salinidad y a la temperatura en plantas de zonas templadas aumentando así su potencial para colonizar ambientes extremos.

En cuanto a si los hongos endófitos son “**mutualistas**” las pruebas son en muchos casos inconclusas, ya que deberían cumplirse los postulados de Koch, es

decir que: 1°- la ocurrencia del endófito debe estar asociada al efecto benéfico, 2°- el endófito debe ser aislado del tejido en el cual se observa el efecto benéfico y obtenido en cultivo puro, 3°- el endófito cultivado debe causar el efecto beneficioso cuando es reinoculado en una planta libre de endófito, y 4°- el organismo debe ser reaislado de la planta experimentalmente infectada. Los estudios que cumplen completamente los 4 postulados son pocos, ya que es imposible obtener árboles adultos libres de endófitos, pero sí plántulas y semillas. Arnold *et al.* (2003) inocularon hojas de plántulas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) libres de endófitos, con un grupo de hongos endófitos aislados de tejidos asintomáticos naturalmente infectados y observaron un descenso significativo de necrosis y mortalidad en las hojas, producida por un virulento patógeno foliar (*Phytophthora* sp. de Bary), aumentando por consiguiente la resistencia frente a dicho patógeno. En la col china (*Brassica campestris* L.), el hongo *Heteroconium chetospira* (Grove) M.B. Ellis, endófito de raíz, induce resistencia del huésped a patógenos y suprime completamente la enfermedad producida por el patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin (Usuki *et al.* 2002). Por otro lado, algunos endófitos como *Trichoderma martiale* Samuels, aislado de albura de *T. cacao*, poseen una importante capacidad como potencial organismo de control biológico (Hanada *et al.* 2008).

Por el contrario, Costa Pinto *et al.* (2000) pusieron en evidencia que las infecciones asintomáticas producidas por dos especies de hongos endófitos (*Colletotrichum musae* Arx y *Fusarium moniliforme* J. Sheld.) llevan a una reducción en la capacidad fotosintética en hojas de bananero, mostrando en este caso un efecto negativo de la infección endofítica.

En cuanto a la “**patogenicidad**”, se ha considerado que algunos endófitos mutualistas han evolucionado de hongos patógenos o parásitos (Carroll 1988, Saikkonen *et al.* 1998). Según Sieber 2007, las comunidades de hongos endófitos en algunas especies de plantas están dominadas por hongos que son considerados patógenos, por ejemplo especies de *Apiognomonia*, *Ophiovalsa*,

Pezicula o *Phomopsis*. Sin embargo estos “patógenos” han coevolucionado con sus hospederos y pueden por ello no ser muy virulentos, y los síntomas producirse de manera limitada y localizada en algunas ramas y hojas de un árbol.

Muchos de esos hongos patógenos se introducen porque ellos no causan serios problemas en su lugar de origen, y algunos incluso pueden ser endófitos en su hospedante natural. En contraste, cuando un hongo es introducido desde una localidad muy lejana (por ejemplo, otro continente) encuentra especies de plantas con las cuales no coevolucionó y por consiguiente no desarrollaron resistencia contra ese hongo. Consecuentemente el hospedante es altamente susceptible y algunos de esos organismos pueden ser serios patógenos y tener efectos devastadores.

Según FAO (2004), la cuarentena de las plantas debe incluir el estudio de riesgo de peste por hongos endófitos. Sin embargo los patógenos con alta virulencia muy raramente son detectados como endófitos ya que su período de latencia es muy corto. Por otra parte, una alta frecuencia de colonización interna de los tejidos sanos de las plantas es una clara indicación de baja virulencia de un hongo.

La producción de enzimas, toxinas y proteínas pueden indicar la virulencia de un patógeno en la interacción con su hospedero.

Las fitotoxinas son en su mayoría metabolitos secundarios de bajo peso molecular capaces de distorsionar la actividad vital de las células vegetales o causar su muerte a concentraciones por debajo de 10mM. Diversos organismos son capaces de producir fitotoxinas, tales como bacterias, plantas, insectos fitófagos y particularmente los hongos fitopatógenos son los más conocidos como productores de fitotoxinas. Hongos de diversos taxa y grupos ecológicos son capaces de producir metabolitos fitotóxicos. El efecto sobre las plantas se expresa en diferentes síntomas, por ejemplo marchitamiento, supresión del crecimiento, clorosis, necrosis y manchas en partes aéreas. Dependiendo del papel que cumplen en la patogenicidad las fitotoxinas se dividen en patotoxinas y vivotoxinas. Las patotoxinas actúan en bajas concentraciones y son un prerequisite para la infección de las plantas por patógenos necrótrofos (ejemplo,

Alternaria spp., *Cochliobolus* spp., *Drehslera* spp). Las cepas mutantes incapaces de producir patotoxinas pierden la virulencia (Berestetskiy 2008) .

Las vivotoxinas son sintetizadas por patógenos en los tejidos de las plantas infectados y cuando alcanzan una concentración apropiada llevan a la aparición de síntomas de enfermedad. Los mutantes de fitopatógenos que no producen vivotoxinas pueden mantener la virulencia, por ejemplo *Leptosphaeria maculans* (Fuckel) Ces. & De Not. incapaz de producir sirodesmina PL (Sock & Hoppe 1999).

Si en los tejidos vivos de una planta se observa algún síntoma, puede concluirse que el agente causal forma fitotoxinas, que juegan un papel importante en la patogénesis (Berestetskiy 2008).

1.8. Presencia de hongos entomopatógenos como endófitos

El interés en el estudio de los hongos endófitos se ha incrementado debido a que son ubicuos y presentan una gran diversidad y variedad de funciones (Arnold & Lutzoni 2007). Algunos hongos endófitos protegen a las plantas hospederas contra patógenos y herbívoros, y algunos hongos patógenos de insectos tradicionalmente conocidos han sido aislados como endófitos, incluyendo especies de *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* e *Isaria* (Vega 2008; Vega *et al.* 2008).

Se han descrito varias funciones para los hongos entomopatógenos, incluyendo su presencia como endófito, antagonistas de enfermedades de plantas, colonizadores de la rizosfera y promotores del crecimiento de las plantas (Vega *et al.* 2009).

Los hongos entomopatógenos poseen un conjunto de mecanismos que les permiten causar la muerte del insecto hospedero y la asimilación de materiales, siendo fundamental la producción de enzimas y de toxinas. La variación en la virulencia de los entomopatógenos está relacionada con la producción de enzimas que le permiten penetrar la cutícula del insecto hospedero. Se han realizado numerosos estudios enfocados a establecer el significado biológico de enzimas y toxinas en las interacciones insecto-patógeno (Hajek & St. Leger, 1994).

Es sabido que una limitación importante para mejorar la producción agrícola son las pérdidas de rendimiento causadas por insectos, enfermedades y malezas. El control de los insectos se ha realizado principalmente por insecticidas químicos además del uso de plantas transgénicas que expresan resistencia a los mismos. Pero, pese al marcado incremento en el uso de plaguicidas las pérdidas se han mantenido constantes (Oerke 2006).

Un importante mecanismo para el control de insectos plaga puede ser el uso de hongos entomopatógenos, presentándose como una alternativa para mitigar los efectos adversos sobre el ambiente y obtener productos seguros para el consumo humano. El estudio de los hongos endófitos ofrecen también una alternativa en la búsqueda de nuevas cepas de hongos entomopatógenos efectivas para el control de insectos considerados plaga.

1.9. Actividad enzimática de los endófitos: producción de enzimas degradadoras de componentes estructurales de la plantas

El modo de nutrición que presentan los hongos, ha tenido como resultado la evolución y secreción de baterías de enzimas que catabolizan polímeros orgánicos complejos. Esto, sumado a la diversidad de sustratos que los diferentes grupos ecológicos de hongos son capaces de colonizar, hace que no sea sorprendente que el 60% de las enzimas corrientemente usadas en procesos industriales sean de origen fúngico. Dichas enzimas provienen principalmente de 5 géneros: *Aspergillus*, *Humicola*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma* (Suryanarayanan *et al.* 2012). Esto permite pensar que los hongos endófitos puedan también ser considerados como una fuente potencial para la obtención de nuevas enzimas más eficientes en procesos de biocatálisis.

Los hongos son los principales descomponedores de restos vegetales, esto es debido a su capacidad de producir enzimas extracelulares lignocelulolíticas.

Es de destacar la importancia de los hongos en el ciclo del carbono, estos cumplen un rol clave en lo que respecta a la re-translocación de nutrientes y al desempeño como descomponedores primarios, teniendo un papel central en la descomposición de lignina y carbohidratos poliméricos, los cuales son los componentes mayoritarios de los ecosistemas vegetales (Oses *et al.* 2006; Osono 2006). Esto se debe a su amplia tolerancia a la acidez y a su capacidad en la producción de un alto rango de sistemas enzimáticos (Korkama-Rajala *et al.* 2008).

La pared celular vegetal está compuesta principalmente de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y pectina que están unidos con proteínas y lignina, formando una estructura rígida y compleja. Aproximadamente unas 4×10^9 y $0,8 \times 10^9$ toneladas de celulosa y lignina respectivamente se producen anualmente en el planeta tierra, sin embargo no existe una acumulación masiva de estos compuestos, producto de la existencia de hongos y bacterias que degradan tales componentes (Ortiz 2009).

La degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares (Aro *et al.* 2005). Tres de las enzimas más destacables, involucradas en la biodegradación de tales compuestos son: celulasas, pectinasas y ligninasas.

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

Una hipótesis para la función de las especies de *Xylaria* endófitas propone que los hongos endófitos están simplemente esperando que el hospedero comience la senescencia, momento en el cual puede iniciar la descomposición de los materiales de la pared celular (Petrini & Petrini 1985, Whalley 1996). Los hongos endófitos emplean esta estrategia teniendo una ventaja frente a sus competidores saprobios por tener asegurado el sustrato antes que comience la descomposición (Carrol 1995; Davis *et al.* 2003).

Es necesario explorar la función de los hongos endófitos colonizadores de madera, especialmente en los procesos naturales como la biodegradación de biomasa vegetal (Hoff *et al.* 2004; Oses *et al.* 2008).

1.10. Actividad metabólica de especies endofitas: producción de metabolitos secundarios

Algunas especies de hongos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios y sustancias insecticidas, antibacteriales, antifúngicas y tóxicas para mamíferos (Siegel y Schardl 1991). Considerando que seis de cada 20 de los medicamentos más comúnmente prescritos son de origen fúngico (Gloer 1997), y que sólo aproximadamente el 5% de los hongos han sido descritos (Hawksworth 1991, 2001), los hongos ofrecen un enorme potencial como fuente de nuevos metabolitos para elaboración de medicamentos y para usos industriales y agrícolas.

Los hongos endófitos están adaptados para permanecer en un ambiente metabólicamente agresivo, expuestos a las defensas del hospedero (Cabral *et al.* 1993; Peters *et al.* 1998; Schulz *et al.* 1999). La capacidad de permanecer en un ambiente hostil como son los tejidos vivos, podría explicar el aumento de la potencial habilidad sintética de compuestos con bioactividad de los endófitos (Suryanarayanan *et al.* 2009). Algunos géneros de hongos aislados comúnmente como endófitos en numerosas plantas, incluyen especies productoras de una gran cantidad de nuevos compuestos y son llamadas “especies creativas” (Dreyfuss & Chapela 1994).

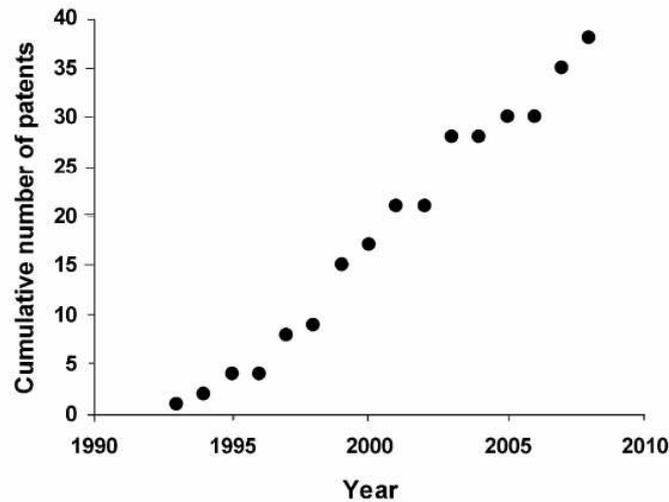
El hecho que la proporción de nuevos compuestos producidos por endófitos (51%), es considerablemente mayor que los producidos por aislamientos del suelo (38%), demuestra que los endófitos pueden ser una buena fuente de nuevos metabolitos secundarios sugiriendo que esos metabolitos tienen una función importante en la estrategia de vida endofítica (Schulz *et al.* 2002). Estos hongos han sido relativamente poco estudiados como fuente potencial de nuevos

productos naturales. Un paso previo de real importancia es la selección de las plantas para investigar la presencia de endófitos. Se han propuesto como posibles criterios de elección de plantas aquéllas que habitan ambientes únicos, endémicas, con una longevidad inusual, las que son utilizadas por poblaciones indígenas o plantas que crecen en áreas donde existe una gran diversidad o han sido poco exploradas. El estudio de productos naturales, y de los organismos que los producen, ofrece una importante oportunidad para la innovación en el área de la obtención de nuevas drogas y agroquímicos. Los metabolitos secundarios, definidos como compuestos de bajo peso molecular no requeridos para el crecimiento en cultivo puro, son producidos como una adaptación para funciones específicas en la naturaleza (Demain 1981) y algunos son característicos de determinados biotopos (Schutz 2001). La búsqueda de nuevos compuestos puede orientarse a microorganismos que habiten biotopos únicos dado que éstos están sujetos a interacciones metabólicas y ambientales que como consecuencia podrían producir un número mayor de metabolitos.

Los productos naturales, metabolitos derivados de plantas, microorganismos o animales, fueron utilizados por el hombre hace cientos de años y algunos de ellos o sus derivados aun usados en medicina. Actualmente en China existen 5000 plantas o productos derivados de ellas que forman parte de la farmacopea (Baker *et al.* 2000). El ejemplo mas conocido y universalmente utilizado es el acido acetil salicílico cuyo origen natural es a partir de salicilina que se encuentra en plantas del género *Salix* y *Populus*. Muchas tribus en el Amazonia y otras regiones han identificado plantas que utilizan para tratar síntomas de varias enfermedades (Isaacs 2002). Los Mayas ya utilizaban hace 3000 años los hongos que crecían sobre los granos de maíz para el tratamiento de problemas intestinales y las tortillas contaminadas con *Penicillium* para la curación de heridas de piel (Buss & Hayes 2000). Actualmente los compuestos basados en productos naturales tienen un alto impacto en la medicina moderna dado que el 40% de las drogas que se utilizan son derivadas de ellos. El 49% de los productos químicos nuevos registrados por la FDA (Food and Drug Administration) son productos naturales o derivados de ellos (Brewer 2000).

Desde la publicación de Stierle *et al.* (1993) ha habido un incremento sostenido del número de patentes estadounidenses donde los hongos endófitos producen importantes metabolitos con diversa actividad biológica (Priti *et al.* 2009) (Figura 4).

Figura 4. Número acumulado de patentes estadounidenses otorgadas en hongos endófitos productores de metabolitos importantes y que presentan una actividad de importancia biológica. Tomado de Priti *et al.* 2009



Estudios recientes sobre metabolitos biológicamente activos de microorganismos endófitos presentes en la planta medicinal *Ginkgo biloba* Engler han mostrado que cultivos de *Colletotrichum* sp. contienen flavonas con potentes actividades anticancerígenas y antioxidantes. También se aislaron nuevos metabolitos cytotóxicos de *Chaetomium globosum* Kunze aislado como endófito de hojas de *G. biloba* (Qin *et al.* 2009).

A modo de ejemplo, en la tabla 4 se muestran algunos de los numerosos hongos endófitos, los metabolitos producidos y su actividad.

Tabla 4. Algunos metabolitos producidos por hongos endófitos

Espece fúngica	Producto	Aislado de	Acción	Referencias bibliograficas
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetomugilinas A y D Chaetoglobosinas A y C	<i>Ginkgo biloba</i>	Actividad inhibitoria frente a <i>Mucor miehei</i> y <i>Artemia salina</i>	Qin <i>et al.</i> (2009)
<i>Colletotrichum gloeosporiodes</i>	Acido colletotricico	<i>Artemisia mongolica</i>	Antibacteriano y antifungico de <i>Dreschlera sativa</i>	Zou <i>et al.</i> (2000)
<i>Cryptosporiosis quercina</i>	Criptocandina A	<i>Tripterigeum wilfordii</i>	Actividad antifúngica (<i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>)	Li <i>et al.</i> (2000)
<i>Cytonema</i> sp.	Acido citonico A y B.	-	Antiviral de citomegalovirus	Guo <i>et al.</i> (2000)
<i>Fusarium</i> sp	Agente antifúngico cr 377	<i>Selaginella pallescens</i>	Potente contra candida albicans	Brady & Clardy (2000)
<i>Muscodor albus</i> ; <i>M. roseus</i>	Mezcla de metabolitos volátiles	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Fungicida	Strobel <i>et al.</i> (2001)
<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	Jesterona	-	Actividad anti-Oomycete	Li & Strobel (2001)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Ácido ambuico; Pestalotiopsinas A y B	<i>Torreya taxifolia</i>	Actividad antifúngica Actividad antioxidante	Harper <i>et al.</i> (2001) Harper <i>et al.</i> (2003) Pulici <i>et al.</i> (1996) Strobel <i>et al.</i> (2002)
<i>Phomopsis</i> sp.	Fomopsicalasina	-	Actividad antibacterial frente a <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Horn <i>et al.</i> (1995)
<i>Taxomyces andreanae</i>	Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancerígeno	Stierle <i>et al.</i> (1993) Strobel <i>et al.</i> (2001)

<i>Xylaria</i> sp.	Xantonas	<i>Glochidion ferdinandi</i>	Antibacterial frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y antimicótica frente a <i>Candida albicans</i>	Healy <i>et al.</i> (2004)
--------------------	----------	------------------------------	--	----------------------------

1.11. Plantas neotropicales en Uruguay, relevamiento de hongos endófitos

En el Uruguay muchas especies que componen los montes nativos ubicados a lo largo de los ríos, en sierras y quebradas son especies neotropicales. La mayor parte (13%) de las especies arbóreas y arbustivas de la flora uruguaya pertenecen a la familia Myrtaceae, muchas de estas especies son importantes ya sea por la producción de aceites esenciales, por su uso medicinal o por sus productos maderables.

Legrand (1968) supone correcta la teoría de la inmigración hacia el sur de la flora tropical por lo que admite que el mayor flujo de estas poblaciones proviene del estado de Santa Catalina en Brasil, proviniendo unas pocas especies de las cuencas del Río Paraná y del Uruguay. Sostiene que el país puede dividirse en dos mitades de norte a sur, cuya línea media divisoria va desde la desembocadura del Río Negro hasta el norte de la Laguna Merín. A la mitad superior de esta región la llamó norte, donde encontró 30 especies, 23 de ellas exclusivas, no pasando en estado natural su límite austral. En la región que llamó sur, que comprende la cuenca del Río de la Plata, viven sólo 7 especies y 1 variedad y ninguna es exclusiva. Dentro de las especies que pasan el límite del Río Negro y llegan hasta la región sur se encuentran *Myrrhimum atropurpureum* Bent., *Myrcianthes cisplatensis* (Camb.) Berg. y *Eugenia uruguayensis* Camb. Estas comunidades de plantas poco estudiadas que se encuentran en el límite de su distribución son susceptibles de estar colonizadas por hongos endófitos, algunos

de los cuales pueden ser especies nuevas productoras de nuevos productos naturales.

El conocimiento de los hongos endófitos en Uruguay es escaso y reciente, habiéndose iniciado su estudio en Myrtaceae nativas (Bettucci *et al.* 2004) con el propósito de conocer posibles fuentes de patógenos de plantaciones comerciales de *Eucalyptus* spp. Los estudios de hongos endófitos en plantas de *Eucalyptus* spp., Citrus, Vid, y *Pinus* spp. (Bettucci & Alonso, 1997; Bettucci *et al.* 1997; 1999; 2004; Lupo *et al.* 2001; Simeto *et al.* 2005) fueron realizados con el propósito de comparar estas comunidades con las presentes en tejidos lesionados y evaluar la presencia de patógenos potenciales, crípticamente ubicados en tejidos activos y la potencial patogenicidad de alguna de las especies como así también seleccionar la capacidad antagonista potencial frente a otras especies fúngicas.

Con la experiencia generada a partir de estos estudios, en este trabajo planteamos iniciar el aislamiento, identificación y caracterización de los grupos de hongos endófitos que habitan en 3 especies de plantas nativas: *Myrrhinium atropurpureum*, *Myrcianthes cisplatensis* y *Eugenia uruguayensis* pertenecientes a la familia Myrtaceae que se distribuyen naturalmente en todo el país, como una fuente de diversidad fúngica. Evaluar la capacidad de producir enzimas degradadoras de los componentes estructurales de las plantas y detectar la capacidad potencial de producir metabolitos con actividad antimicrobiana.

1.12. Características de las plantas seleccionadas para el estudio

***Myrrhinium atropurpureum* var. *octandrum* Bent.**

Nombre vulgar: "Palo de Fierro". Antes *Myrrhinium loranthoides* (Hook et Arn.) Burret. Este árbol alcanza los 3-4 metros de altura y presenta corteza persistente oscura, inerte. El follaje es persistente, de color verde oscuro con hojas simples, opuestas, elíptico-lanceoladas, de borde íntegro, glabras, con la nervadura principal hundida.

La inflorescencia es una cima corimbosa directamente sobre ramas y ramillas leñosas. Las flores tienen pétalos carnosos blanco perlados. Los estambres son

largos de color rojo, muy vistosos. La floración es a fines de invierno y principio de primavera. El fruto es una baya ovoide de 5 milímetros de diámetro, de color negro, con persistencia de restos florales. Fructifica en verano y otoño. Esta planta crece en monte serrano y también en el monte ribereño. Su área de dispersión es Brasil, Argentina y Uruguay (Brussa & Grela 2007).



Figura 5. *Myrrhinium atropurpureum*, hojas, flores, frutos y detalle de rama

***Myrcianthes cisplatensis* (Camb.) Berg.**

Nombre vulgar: “Guayabo Colorado”

Este árbol alcanza una altura de 6 metros, posee corteza lisa, castaño rojiza. El follaje es persistente, las hojas son simples, elíptico lanceoladas, glabras, coriáceas, de color verde oscuro, brillante en el haz, verde claro en el envés. Las flores son blanco amarillentas, pequeñas, axilares, dispuestas de a tres sobre un pedúnculo común. La floración es en verano. El fruto es una baya negra, de 6-10 mm de diámetro, con una o dos semillas. Crece en monte serrano y ribereño. El área de dispersión es Brasil, Argentina y Uruguay (Brussa & Grela 2007).



Figura 6. *Myrcianthes cisplatensis*, hojas y detalle de tronco

***Eugenia uruguayensis* Camb.**

Nombre vulgar: "Guayabo Blanco"

Este arbusto en general alcanza entre 3 y 5 m de altura, la copa es densa y la corteza caduca con maculas típicas formando manchas a lo largo de tronco. Las hojas son simples, opuestas, ovales, ovoideo-elípticas hasta largamente elípticas, subcoriáceas, glabras y el pecíolo de mas o menos 1 cm. Las flores son blancas, raramente solitarias en general se disponen en cortas umbelas en las ramitas leñosas, cortamente pediceladas. La floración es en el verano, período en el que también se verifica la maduración de los frutos. Presenta fruto oblongo o semipiriforme, 1-1,5 cm de largo que contiene varias semillas.

Crece en montes ribereños. El área de dispersión es Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay (Brussa & Grela 2007).



Figura 7. *Eugenia uruguayensis*, hojas y detalle de tronco

2. HIPÓTESIS

En los órganos de las especies de plantas ubicadas en regiones neotropicales y templadas existen diferentes grupos funcionales de hongos endófitos. Algunas de estas especies de endófitos presentes en plantas de los bosques nativos del Uruguay pueden ser especies productoras de nuevos productos naturales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Examinar y comparar los ensambles fúngicos endofíticos presentes en 3 especies de plantas nativas ampliamente distribuidas en nuestro país y evaluar las diferentes funciones que pueden cumplir los hongos endófitos, como degradadores de biomasa vegetal, como potenciales patógenos de plantas e insectos, y como antagonistas microbianos capaces de producir metabolitos secundarios con actividad biológica.

3.2. Objetivos específicos:

- 1) Aislar, identificar y cuantificar las especies de hongos endófitos presentes en 3 especies de plantas nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae.
- 2) Evaluar la asociación entre las especies fúngicas y las especies de plantas en las que se encuentran (preferencia por el hospedante), así como la preferencia por diferentes órganos (hoja o rama) y tejidos (corteza y xilema).

- 3) Estudiar la potencial capacidad degradadora de biomasa vegetal de los hongos endófitos aislados, mediante la evaluación semicuantitativa de la producción de enzimas pectinolíticas, celulolíticas y lignolíticas.
- 4) Evaluar la producción de metabolitos fitotóxicos por algunas especies de hongos endófitos aislados, pertenecientes a géneros que incluyen hongos fitopatógenos.
- 5) Evaluar la capacidad de algunas de las cepas aisladas de producir metabolitos con potencial actividad antibacteriana y antimicótica.
- 6) Evaluar la capacidad patogénica de los endófitos pertenecientes a géneros que incluyen hongos entomopatógenos conocidos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron especies de plantas nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae, naturalmente distribuidas en todo el territorio Uruguayo en particular en zonas riparias y de serranía. Se colectaron ramas de *Myrrhinium atropurpureum* Bent., *Myrcianthes cisplatensis* (Camb.) Berg. y *Eugenia uruguayensis* Camb. en la zona sur del país. Los sitios de muestreo fueron Parador Tajés y Parque Arequita (figura 8).

Las tres especies de plantas seleccionadas para este estudio se encuentran distribuidas en forma espaciada, pues se encuentran en el límite de su distribución geográfica.



Figura 8. Sitios de muestreo

4.1. Descripción del área de estudio

El área de estudio se encuentra en la zona sur del Uruguay, los sitios seleccionados fueron: la localidad Parador Tajés y el Parque Nacional Arequita.

Parador Tajés: situado en un parque de 62 hectáreas en 34 ° 36'28 "S 56 ° 28'20" O. Forma parte de los humedales protegidos del río Santa Lucía en el Departamento de Canelones . Es un bosque ribereño que ocupa zonas bajas, en

el margen del Río Santa Lucía. Las especies de plantas se distribuyen en franjas paralelas al curso de agua, desde especies hidrófilas a las xerófilas. Algunas especies que crecen en los márgenes con las raíces que están en contacto directo con el agua, o en zonas cercanas son *Salix humboltiana* Willd., *Cephalanthus glabratus* (Spreng.) K. Schum, *Helianthus sellowianus* Müll. Arg., *Sebastiania Commersoniana* (Baill.) L.B. Smith, *Pouteria salicifolia* (Spreng.) Radlk. y *Erythrina crista-galli* L. En las zonas alejadas y menos húmedas están presentes *Allophylus edulis* (St.Hill.) Radlk., *Myrtus communis* L., *Myrsine parvula* (Mez.) Otegui, *Scutia buxifolia* Reiss. y *Eugenia uruguayensis* Cambess., entre otros. Por último, lejos del río aparecen especies xerófilas, como *Celtis tala* Gillies Planch., *Berberis laurina* Billb. y *Lithraea molleoides* (Vell.) Engler. (Brussa & Grela 2007).

Parque Nacional de Arequita: (34° 22' 39" S 55°14' 17" O), ubicado a unos 11 kilómetros al norte de la ciudad de Minas en el departamento de Lavalleja. Es un área protegida de aproximadamente 950 hectáreas administrada en parte por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, por la Intendencia Municipal de Lavalleja y por los propietarios de las tierras. El sitio se compone de dos cerros de origen volcánico, el Cerro Arequita y el Cerro de los Cuervos, separados por un valle donde pasa el Río Santa Lucía. Sobresale paisajísticamente el Cerro Arequita que es una elevación de unos 230 metros de altura de origen volcánico. En las laderas del cerro se encuentra un tupido monte serrano donde se pueden apreciar especies vegetales típicas de este ambiente, tales como: *Scutia buxifolia*, *Schinus molle* L., *M. atropurpureum*, *Acacia caven* (Mol.) Molina, *C. tala*, *A. edulis* y *M. cisplatensis*.

4.2. Muestreo

En el monte ripario, de la localidad Parador Tajés, se colectaron ramas y hojas de *Eugenia uruguayensis* y en el monte de serranía, del Parque Nacional de Arequita se colectaron ramas y hojas de *Myrrhinium atropurpureum* y de *Myrcianthes cisplatensis*.

El muestreo se realizó de la misma manera para las 3 especies de plantas.

Se seleccionaron 5 ejemplares de cada especie, teniendo en cuenta que fueran árboles sanos. El aspecto saludable de las plantas fue determinante para la selección de las mismas. De cada especie se colectaron 10 ramas sanas de aproximadamente 1cm de diámetro en la parte basal, con hojas asintomáticas (2 ramas de cada planta). Se colocaron en bolsas de polietileno para evitar la desecación y se transfirieron al laboratorio para su procesamiento.

4.3. Aislamiento de hongos endófitos

4.3.1. Hojas

Se separaron 10 hojas sanas de cada una de las 10 ramas colectadas para cada especie, tomando entonces un total de 100 hojas de cada especie de planta.

De cada hoja se separó la lámina del pecíolo, y de las láminas se cortaron discos de 5 mm de diámetro con un sacabocado.

Para cada especie de planta se obtuvieron en total 100 segmentos de pecíolo y 100 discos de lámina.

4.3.2. Ramas

De cada rama se seccionaron 10 segmentos de aproximadamente 2 x 4 mm, totalizando de cada especie de planta 100 segmentos. De cada segmento, se separó la corteza del xilema obteniéndose 100 fragmentos de cada tejido.

4.3.3. Desinfección superficial

Todos los segmentos correspondientes a hojas y ramas se desinfectaron superficialmente con etanol 95% 30 s, hipoclorito de sodio 0,5% 2 min y etanol 70% 2 min (Arnold & Lutzoni 2007). Se enjuagaron con agua destilada estéril y se quitó el exceso de agua colocándolos sobre papel de filtro estéril.

Previo a la incubación en medio de cultivo se realizó una prueba de desinfección superficial para asegurar que los aislamientos fúngicos realmente provengan de los tejidos internos (Hoffman & Arnold 2007). Para ello se realizaron impresiones de los diferentes materiales colocando segmentos de los mismos en cajas de Petri

con medio agar malta 2% durante 20 minutos y luego retirándolos de las cajas de Petri previo a su incubación.

4.3.4. Aislamiento de hongos

Se sembraron 100 segmentos de lámina, 100 de pecíolo, 100 de corteza y 100 de xilema, para cada una de las especies de plantas, en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo agar-malta al 2% adicionado con cloranfenicol ($25\mu\text{g ml}^{-1}$) para impedir el desarrollo de bacterias. Se colocaron 10 discos de cada material por caja de Petri (Figura 9).

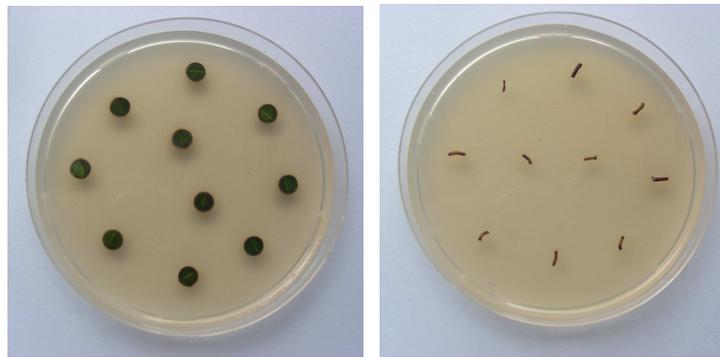


Figura 9. Discos de hojas y segmentos de pecíolos sembrados en cajas de Petri conteniendo medio agar-malta con cloranfenicol

Todas las placas se incubaron en estufa a 25°C . con alternancia de luz-oscuridad. Se utilizó la exposición a luz negra para inducir la esporulación de algunos cultivos.

Se contaron las colonias de hongos emergentes (figura 10) y aquéllos con las mismas características morfológicas en cultivo se consideraron como un morfotipo. Los hongos correspondientes a morfotipos diferentes fueron aislados y transferidos a tubos para su conservación y ulterior identificación.

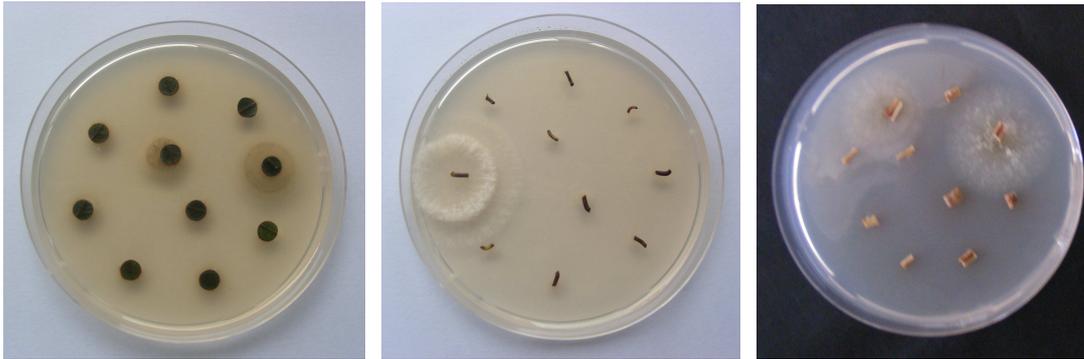


Figura 10. Colonias de hongos emergiendo de segmentos de hojas, pecíolos y ramas

4.4. Identificación de los hongos aislados

La identificación de los aislamientos se realizó en base a las características micro y macromorfológicas, fundamentalmente de las estructuras reproductoras. Las observaciones se realizaron en forma directa a partir de los materiales inoculados utilizando lupa estereoscópica, y también mediante microscopía óptica de los preparados realizados a partir de los cultivos fúngicos, teñidos con colorante azul de algodón y lactofenol.

Los cultivos que no esporulaban después de 6 semanas se consideraron micelios estériles.

Aquellos aislamientos que no esporularon o que no pudieron identificarse por los métodos micológicos habituales, se identificaron mediante características moleculares comparando las secuencias de ITS (espaciadores de transcripción interna específicos del ADNr) ITS1 e ITS2 con la secuencias de la base de datos del GenBank. En aquellos casos que se encontraron porcentajes de homologías bajos (< 95%) utilizando secuencias ITS se amplificó además parte de la secuencia del LSU (subunidad grande del ADNr).

El primer paso fue la extracción del ADN a través de un procedimiento de extracción de Lee & Taylor 1990. La amplificación se realizó por PCR utilizando primers ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') específicos para hongos (White *et al.* 1990)

En el caso de LSU se utilizaron los primers LROR y LR7 (Vilgalys & Hester 1990). El programa de amplificación empleado consistió en un ciclo a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 42°C/1,5 minutos y 72°C/1,5 minutos y un ciclo final de extensión de 72°C, durante 5 minutos. La confirmación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando como marcador molecular 100 bp DNA Ladder (AXYGEM), y su correspondiente visualización mediante tinción con el colorante GelRed TM (Biotium) y observación con un transiluminador de luz ultra violeta (Vilbar Loumart). Ver la figura 11 a modo de ejemplo.

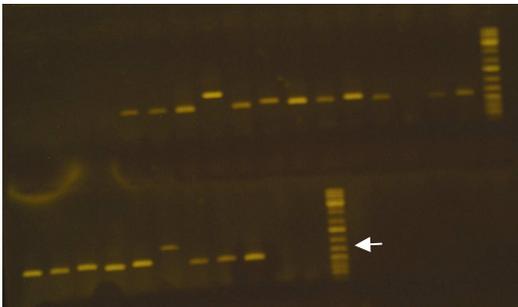


Figura 11. Gel de agarosa donde se observan las bandas de ADN amplificado (secuencias ITS), de diferentes aislamientos de endófitos . A la derecha un marcador molecular (flechas: 600 pb aproximadamente)

Por último, los productos fueron secuenciados en los Laboratorios MACROGEN, Corea. Dichas secuencias fueron analizadas con el software MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011) y posteriormente se analizó su similitud con las secuencias en la base de datos del GenBank usando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.5. Evaluación de la capacidad degradadora. Producción de enzimas extracelulares

Se evaluó la capacidad de los hongos endófitos aislados de producir enzimas celulolíticas, lignolíticas y pectinolíticas.

Se realizó la determinación semicuantitativa en placa de los 3 complejos enzimáticos utilizando medios de cultivo sólidos específicos.

4.5.1. Endocelulasas

La capacidad de producir endocelulasas se determinó inoculando los hongos en placas de Petri conteniendo carboximetilcelulosa (CMC) incluida en el medio basal (Eggins & Pugh 1962). Para cada hongo, se inocularon 3 discos de 8mm conteniendo micelio por placa de Petri. Se incubaron a 25°C durante 3 días.

Luego se inundó la superficie del medio de cultivo en la caja de Petri, cubriendo completamente el micelio crecido a partir de los discos inoculados, con una solución del colorante Rojo Congo 0,25% en Tris-HCl 0,1 M pH 8 y se dejó actuar durante 30 minutos. Se retiró el colorante y se realizó un lavado con una solución de NaCl 0,5M en Tris-HCl 0,1 M pH 8, observándose como resultado positivo para la producción de enzimas la presencia de un halo de decoloración correspondiente a la degradación de la celulosa alrededor de la colonia (Paterson & Bridge 1994). Se midió el diámetro del halo alrededor de la colonia (DH) y también el diámetro de crecimiento del micelio (DM). La actividad enzimática (AE) se calculó como el cociente DH/DM. Los valores mayores que 1 indican que existe una difusión de las enzimas producidas por el micelio hacia el medio de cultivo, cuanto mayor es la relación, mayor es la actividad enzimática.

4.5.2. Ligninasas

La determinación en placa se realizó utilizando como sustrato sustituto de la lignina, el colorante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). Los hongos se inocularon por triplicado en cajas de Petri con medio de cultivo agar malta 2% conteniendo 0.05 % RBBR (Machado *et al.* 2005). Se incubaron a 25°C durante 15 días y se observó la formación de zonas de decoloración en el medio debido a la biodegradación del colorante. La actividad enzimática se evaluó indicándose como negativa (-) cuando no se observaba ninguna decoloración del medio de cultivo, y como positiva (+) cuando se observaba decoloración en el medio, incrementándose desde (+) hasta (++++).

4.5.3. Pectinasas

La actividad pectinolítica se determinó inoculando los hongos por triplicado en medio de cultivo basal conteniendo pectina como única fuente de carbono (Paterson y Bridge, 1994). Se incubaron a 25°C durante 3 días. Luego se inundó la superficie del medio de cultivo cubriendo completamente las colonias con una solución 0,1 % del colorante rojo de Rutenio (Oliveira *et al.* 2006), el cual tiñe la pectina, se dejó actuar durante 1 hora y se retiró el exceso de colorante. Luego se lavó con agua destilada.

Se observó la presencia de halo de decoloración alrededor de las colonias y se midió el diámetro de los mismos. La actividad enzimática (AE) se calculó realizando el cociente entre el diámetro del halo de decoloración (DH) y el diámetro de crecimiento micelial (DM).

4.6. Evaluación de la producción de metabolitos fitotóxicos

Se seleccionaron 29 aislamientos que pertenecen a géneros que se sabe incluyen cepas fitopatógenas y también aquellos aislamientos que produjeron amarillamiento en los segmentos de hojas inoculadas a partir de los cuales emergieron.

Las extracciones de los metabolitos se realizaron a partir de cultivos puros de los hongos en cajas de petri con medio agar malta al 2% (Bettucci *et al.* 2004). La totalidad del medio de cultivo bajo el micelio se seccionó en cuadrículas mediante el uso de bisturí estéril. Los fragmentos de agar conteniendo micelio más los metabolitos que difundieron a partir del crecimiento micelial, se colocaron en frascos estériles y se realizaron 3 extracciones mediante adición del solvente orgánico Acetato de Etilo, que al evaporarse, permite obtener un extracto con metabolitos fúngicos. Se colocaron 25 segmentos de 4x4mm, se cubrieron totalmente con 40ml de acetato de etilo y se dejó 24hs. Luego se retiró el acetato de etilo colectándolo en un vial. Se volvieron a cubrir los fragmentos de agar y micelio con acetato de etilo y se repitió el procedimiento 3 veces colectando el

acetato de etilo en el mismo vial. Se dejó evaporar el solvente colectado obteniéndose un extracto con metabolitos fúngicos.

Una vez obtenidos los extractos se evaluó la fitotoxicidad potencial sobre hojas juveniles de *E. uruguayensis*. Esta especie fue seleccionada por presentar, en condiciones de campo, numerosas manchas foliares, indicando que serían sensibles para realizar los estudios de fitotoxicidad.

Se utilizó la metodología usada por Assante *et al.* (2009) para determinar fitotoxicidad de extractos de *Mycosphaerella cryptica* (Cooke) Hansf. sobre *Eucalyptus* spp. Para ello se realizaron seis perforaciones con una aguja delgada en la superficie de las hojas a cada lado de la nervadura central. De un lado se colocaron 10µl del extracto fúngico a evaluar resuspendido en acetona y del otro lado se colocaron 10µl de acetona como control. Se realizaron 5 réplicas para cada extracto fúngico. Luego se colocaron en cámara húmeda durante 20 días y se evaluó la aparición de síntomas como manchas (necrosis) en las hojas que indicaría la presencia de fitotoxinas.

Los resultados se indicaron como (-) cuando no se observó presencia de síntoma en las hojas (+) cuando se observó un síntoma leve alrededor de las perforaciones y (++) cuando se observó desarrollo de síntoma en toda la zona de aplicación del extracto.

4.7. Evaluación de la capacidad antagónica. Producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria frente a bacterias y hongos.

Se seleccionaron 19 aislamientos pertenecientes a géneros y especies previamente conocidos por ser productores de metabolitos bioactivos y que mostraron algún tipo de actividad antagónica frente a otros hongos cuando crecían próximos, en la misma caja de Petri, al emerger de los diferentes órganos y tejidos inoculados. Se tomó en cuenta por ejemplo, inhibición a distancia, detención del crecimiento, formación de barrera en la zona de contacto entre micelios, inducción a la formación de estructuras de resistencia y deformaciones en la morfología de las hifas.

Estos aislamientos seleccionados fueron evaluados como potenciales productores de metabolitos bioactivos.

La extracción se realizó con acetato de etilo partiendo de cultivos puros en medio agar malta al 2%, se procedió de la misma manera que se realizó la extracción de los metabolitos fitotóxicos.

El efecto antifúngico de los extractos se evaluó frente a las cepas patógenas humanas *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout ATCC 64548 y *Aspergillus fumigatus* Fresen. y los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y el efecto antibacteriano se evaluó frente a las bacterias *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers y *Staphylococcus aureus* Rosenbach ATCC 6538P y las bacterias fitopatógenas *Erwinia carotovora* Smith y *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Dye 1978. Para ello se utilizó la metodología de antibiograma descrita por Baüer *et al.* (1966) con modificaciones, empleando discos de papel de filtro impregnados con los extractos fúngicos. Para estos ensayos se inocularon en cajas de Petri sobre el medio agar malta, 100µl de una suspensión de 10⁶ conidios/ ml de agua destilada en el caso de los hongos; para las bacterias se inocularon 100µl de una suspensión de 10⁶ células bacterianas/ml de solución salina en cajas de Petri conteniendo medio TSA, en ambos casos se esparcieron con un asa de Drigalsky de manera de obtener una distribución uniforme formando un tapiz. En estas cajas de Petri inoculadas con los hongos y las bacterias a evaluar se colocaron sobre el medio de cultivo discos de papel impregnados con 10µl de los extractos fúngicos resuspendidos en acetona, los cuales previamente se dejaron secar. Luego se incubaron a 25°C los hongos y a 35°C las bacterias, la formación de halo de inhibición se consideró como resultado positivo.

Se realizó un control positivo de inhibición para las bacterias usando discos con 10µl de ampicilina 0,2g/ml y para los hongos se usaron discos con 10µl de ketoconazol 2%. El control negativo se realizó utilizando discos de papel impregnados con 10µl de acetona. En todos los casos se midieron los halos de inhibición formados, a partir del borde del disco de papel. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

Por otro lado, se determinó la toxicidad de los metabolitos mediante bioensayo sobre el crustáceo *Artemia salina* L., sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica de muy diversas estructuras químicas (González *et al.* 2007). Para ello se colocaron huevos de *A. salina* en un recipiente con una solución estéril de cloruro de sodio 2,4 %, luego se incubaron a 25°C durante 24 horas. Una vez eclosionadas las larvas, se colocaron en placas de cultivo de células (aprox. 30 larvas por pocillo) en un volumen de 2 ml de solución estéril de cloruro de sodio 2,4 %. Luego se adicionaron por separado, 0,1 ml de los extractos obtenidos de cada uno de los hongos endófitos disueltos en acetona. Se realizaron 6 réplicas y se utilizó sólo acetona para el control. Se incubaron durante 24 horas a 25 °C y luego se determinó la mortalidad de las larvas, mediante la observación bajo microscopio estereoscópico. Se realizó el porcentaje de mortalidad corregido como el porcentaje de sobrevivientes en el blanco menos el porcentaje de sobrevivientes en los tratamientos. La toxicidad de los metabolitos se consideró de acuerdo con el siguiente criterio: 0 - 9% = No Tóxico, 10 – 49% = Levemente Tóxico, 50 – 89% = Tóxico, 90 - 100% = Muy Tóxico (Harwig & Scout 1971; González *et al.* 2007).

4.8. Evaluación de Entomopatogenicidad

A partir de un aislamiento como endófito, del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn, se realizó la evaluación de su capacidad patogénica frente a insectos.

Para ello se estudió la capacidad de esta cepa para infectar hormigas de la especie *Acromyrmex lundii* Guérin-Méneville. Se realizó la caracterización enzimática mediante la determinación de proteasas y quitinasas.

4.8.1. Evaluación de la capacidad patogénica frente a hormigas

Se obtuvieron las esporas de *M. anisopliae* haciendo crecer el hongo en cajas de Petri con medio de cultivo PDA durante 14 días. Para inocular las hormigas (*A. lundii*) se hicieron caminar 15 hormigas en la caja de Petri con el hongo durante 10

minutos, luego se extrajeron con una pinza y se colocaron en placas acondicionadas con un bebedero conteniendo 300µl de agua azucarada al 50% y un algodón saturado con agua para mantener la humedad en la placa. Se colocaron 5 hormigas por placa y se realizaron 3 réplicas. Los testigos se realizaron con hormigas sin pasar por las cajas con hongo, en total se colocaron 15 hormigas inoculadas con *M. anisopliae* y 15 hormigas testigo sin inocular (Bettucci *et al.* 2006). Todas las placas se mantuvieron a 25°C.

Se registró diariamente el número de individuos que permanecían vivos y los muertos. Las hormigas muertas se extrajeron de las cajas con una pinza y se colocaron en otra caja de Petri con algodón saturado con agua para mantener la humedad y favorecer el desarrollo del micelio. Se determinó de esta manera la presencia del hongo *M. anisopliae* en las hormigas muertas.

4.8.2. Caracterización enzimática: determinación de proteasas y quitinasas

Se evaluó la producción extracelular de las enzimas, proteasas y quitinasas, por parte de la cepa de *M. anisopliae* aislada como endófito.

Estas enzimas están relacionadas con la virulencia de los hongos entomopatógenos, siendo ellas las que permiten a las hifas penetrar la cutícula y colonizar los tejidos del insecto hospedero.

La producción de enzimas extracelulares se determinó por digestión del sustrato incorporado (ya sea disuelto o suspendido) en medios de cultivos sólidos. Para ello se inoculó por triplicado el hongo entomopatógeno en cajas de Petri con los medios conteniendo los sustratos para las diferentes enzimas y se incubó durante 7 a 14 días a 25°C. Luego se midió el halo que expresa la actividad enzimática alrededor de las colonias en los medios respectivos.

Para la determinación de proteasas se utilizó caseína de la leche como sustrato y se inocularon 3 discos de 7mm conteniendo micelio y esporas del hongo en cajas de Petri con medio Agar-leche (Varela H. 1998), la producción de proteasas se evidenció como zonas de clareado alrededor de las colonias indicando la hidrólisis del sustrato. Se midió el diámetro de crecimiento de las colonias y también el halo

de clareado. La actividad enzimática (AE) se calculó realizando el cociente entre el diámetro del halo de aclaramiento (DH) y el diámetro de crecimiento micelial (DM). Para la determinación de quitinasas se inoculó de igual manera que para las anteriores, pero en cajas de Petri con medio de sales según Chul-Kang *et al.* (1999) adicionado con quitina coloidal como sustrato (Mier *et al.* 2004). Se midió el diámetro de los halos de producción de enzima y se calculó la actividad enzimática como $AE=DM/DH$.

4.9. Análisis de los datos

La frecuencia relativa de colonización se calculó como el número de segmentos colonizados por un hongo dado, dividido por el número total de segmentos (Bettucci *et al.* 2004)

Para evaluar en qué medida el ensamble de hongos está representado por el muestreo, se realizó la distribución de las abundancias y curvas de acumulación de las especies para cada órgano de cada especie hospedante. Además las curvas de acumulación relativas se compararon con el modelo teórico log-normal usando el test de Kolmogorov-Smirnov (Krebs 1989). Se usó el programa STATISTICA 6.0.

Se calculó la diversidad fúngica en cada tejido, órgano y especie arbórea mediante el Índice de Diversidad de Shannon (H'), usando el programa estadístico MVSP para Windows version 3.21 (Kovach Computing, Anglesey, UK).

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$

s = número de especies
 p_i = proporción de especie i en la comunidad: n_i/N
 n_i = número de individuos de la especie i
 N = número de todos los individuos de todas las especies

Para evaluar las diferencias en la composición endofítica entre hospedantes se realizó un análisis de correspondencias simple usando las especies con una frecuencia relativa de 5% o mayor y que estuvieran presentes en más de un tejido. Para realizar el análisis se aplicó a las frecuencias la transformación log+1 y se usó el programa STATISTICA 6.0.

5. RESULTADOS

5.1. Ensamblés fúngicos presentes en diferentes órganos y tejidos de *Eugenia uruguayensis*, *Myrcianthes cisplatensis* y *Myrrhinium atropurpureum*.

De 1200 segmentos inoculados, pertenecientes a lámina, pecíolo, corteza y xilema de las 3 plantas nativas estudiadas, se obtuvieron 801 aislamientos (separados en 93 morfotipos) pertenecientes a 65 taxa. Del total, 270 aislamientos fueron obtenidos de *M.atropurpureum* (palo de fierro), 239 de *M. cisplatensis* (guayabo colorado) y 292 de *E. uruguayensis* (guayabo blanco).

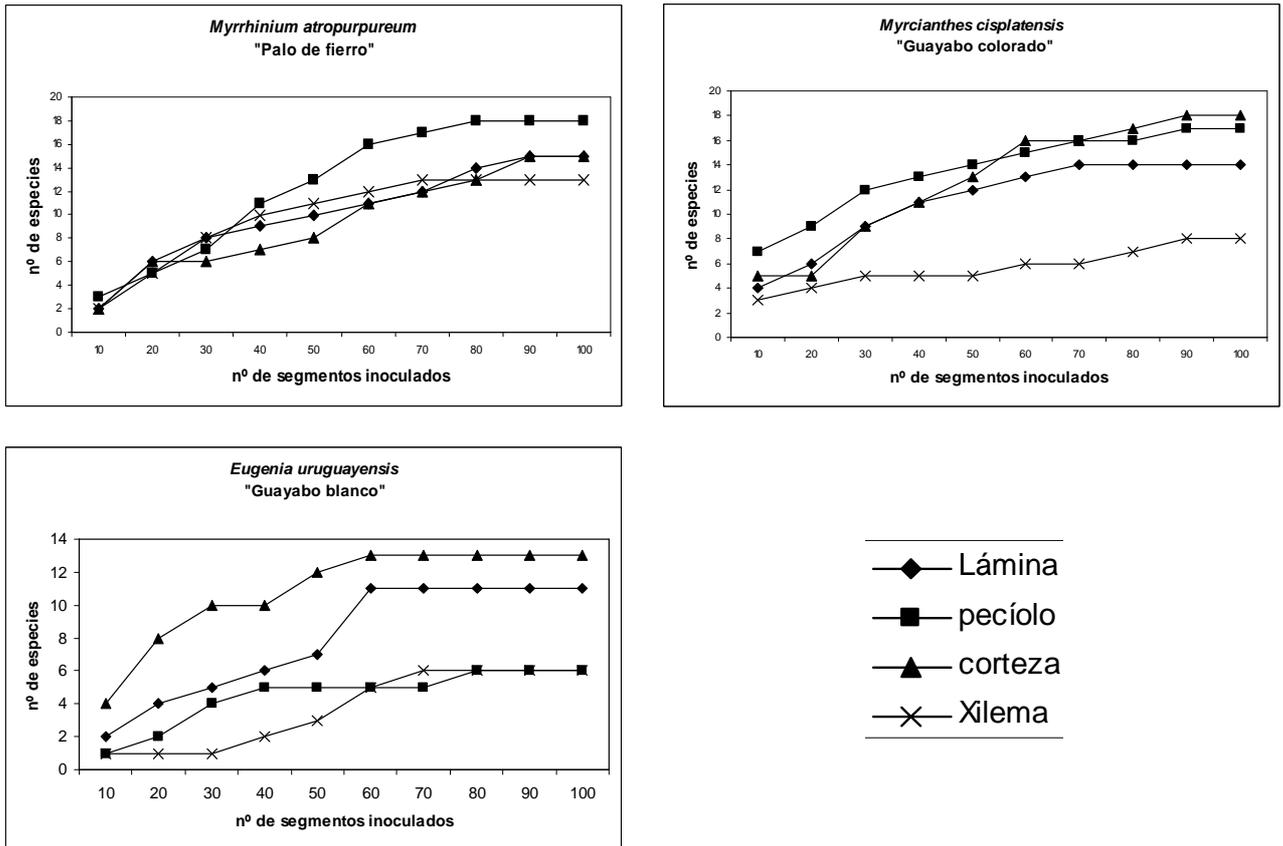
No fue posible asignar especie, género ni grupo a 16 morfotipos que no esporularon y cuyas secuencias de ITS o LSU mostraron muy bajo porcentaje de similitud con las secuencias disponibles en el banco de genes, estos morfotipos se colocaron en 3 grupos de micelios estériles de acuerdo a su coloración. Se identificaron 26 morfotipos (asignados a 26 taxa) en base a sus características morfológicas y reproductivas y los 51 morfotipos restantes que no pudieron ser identificados por morfología fueron colocados en diferentes niveles taxonómicos (36 taxa) basados en los análisis de secuencias ITS o LSU.

De los 65 taxa encontrados, 7 estuvieron presentes en las tres plantas estudiadas, 15 en dos de ellas y 43 solamente de alguna de las tres especies de plantas. De estas últimas 37 fueron obtenidos de un solo tejido y en general con una baja frecuencia relativa. El número de taxa según los tejidos varió entre 5 (en xilema de *E. uruguayensis*) y 16 (en pecíolo y corteza de *M. cisplatensis*, y pecíolo de *M. atropurpureum*).

Las curvas de acumulación de las especies muestran el número de especies diferentes presentes cada 10 segmentos adicionales correspondientes a cada tejido estudiado (Figura 12). La curva se asintotizó entre los 60 – 90 segmentos de la corteza, entre los 70 – 90 del el xilema, entre 80 – 90 del pecíolo y en lámina entre los 60 – 90 segmentos. Esto indicaría que el número de segmentos analizados (100) es suficiente para representar las comunidades fúngicas

presentes en los diferentes tejidos, dado que no se aislaron especies diferentes a partir de los 90 segmentos inoculados en todos los tejidos y en todas las plantas estudiadas.

Figura 12. Curvas de acumulación de especies



Las especies dominantes en la comunidad endofítica fueron: *Phomopsis* spp. (Sacc) Bubák, *Xylaria* sp. (Hill) ex Schrank y *Nigrospora sphaerica* (Sacc) Mason, presentes en las tres plantas. Si bien *Phomopsis* spp. se aisló de los tres hospedantes, su frecuencia fue alta solamente en *E. uruguayensis*. (Tabla 5). *Preussia* spp. (Fuckel), se aisló con alta frecuencia solo en *M. cisplatensis* y *M. atropurpureum*, en tanto *Morinia pestalozzoides* Berl. & Bres. fue aislada con alta frecuencia pero únicamente en *M. atropurpureum*. De los 801 aislamientos endofíticos obtenidos de las 3 plantas estudiadas, 95 correspondieron a Xylariales (12% del total de aislamientos), estando presentes en lámina, pecíolo y corteza de

ramas en las 3 especies de plantas, no obteniéndose ningún aislamiento de xilema. Se destaca su presencia en los tejidos de *M. cisplatensis* donde el 25% de los aislamientos pertenecen a Xylariales.

Tabla 5. Hongos endófitos aislados de tres plantas nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae. Frecuencia de colonización en los diferentes tejidos expresada en porcentaje.

Taxa	Cod.	<i>Eugenia uruguayensis</i> (G.B.)				<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (G.C.)				<i>Myrrhinium atropurpureum</i> (P.F.)			
		Hoja		Rama		Hoja		Rama		Hoja		Rama	
		L	P	C	X	L	P	C	X	L	P	C	X
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	ALT					6	1	3	1	6	3		1
<i>Anthostomella</i> sp. Sacc. (*)										5			
Ascomycota (*)								5					
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	AUR									1	6		
<i>Bartalinia robillaroides</i> Tassi				2									
<i>Beltrania rhombica</i> Penz.			7										
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) de Vries		1			1								1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.					1								
<i>Colletotrichum acutatum</i> J.H. Simmonds													2
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) Penz & Sacc	COG	18		16							7		
<i>Coniochaeta velutina</i> (Fuckel) Cooke (*)			2										
<i>Conoplea fusca</i> Pers. (*)				1									
<i>Corynespora</i> sp. Güssow (*)													5
<i>Daldinia</i> sp. Ces. & De Not. (*)				8									
<i>Diaporthe</i> sp. Nitschke (*)			1							4			
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb.												2	
<i>Eupenicillium brefeldianum</i> (B.O. Dodge) Stolk & D.B. Scott		2											
<i>Gelasinospora retispora</i> Cain												1	
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier										4			
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld & Schrenk		4											
<i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy (*)	GUI						11			11	2		
<i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds .								1					
<i>Lecytophora fasciculata</i> (J.F.H. Beyma) E. Weber, Görke & Begerow (*)	LEC						7						9
<i>Lentinus tigrinus</i> (Bull.) Fr. (*)		1											
<i>Lophiostoma</i> sp. Ces. & De Not. (*)				1									1
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokīn									1				
<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> Crous (*)													1
<i>Morinia pestalozzioides</i> Berl. & Bres. (*)	MOR									2	3	43	1
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & Schwein.) Ditmar								3					
<i>Neofusicoccum australe</i> (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (*)									2				
<i>Neofusicoccum parvum</i> (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips (*)	NEP	3	1							2	5		
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch													8
<i>Nigrospora sacchari</i> (Speg) Mason		3											

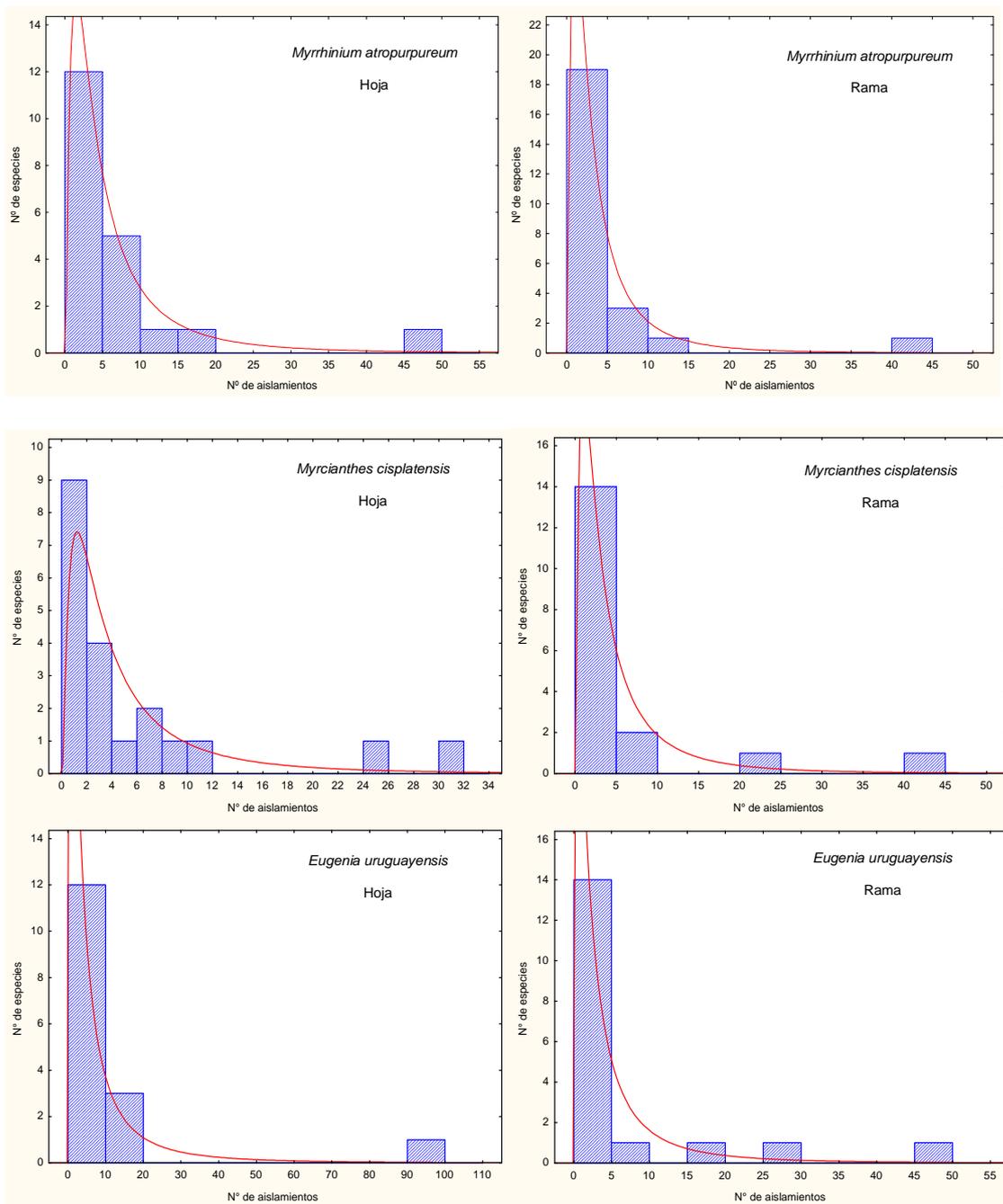
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc) Mason	NSP	2	1		1	4			2	15	5	
<i>Nodulisporium</i> sp. Preuss						2				1		
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier												4
<i>Paraconiothyrium fungicola</i> Verkley & Wicklow (*)	PAR		2		1		5				3	
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm) Steyaert			1		1	1						
<i>Peyronellaea australis</i> Aveskamp, Gruyter & Verkley (*)						1						
<i>Peziza varia</i> (Hedw.) Fr. (*)												1
<i>Phaeoacremonium</i> sp. W. Gams, Crous & M.J. Wingf.	PHA			3						3		
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich (*)								1				
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel									1	3		
" <i>Phomopsis micheliae</i> " C.Q. Chang, Z.D. Jiang & P.K. Chi (*)		12										
<i>Phomopsis</i> spp. (Sacc) Bubák (*)	PHO	20	76	72		2					1	
<i>Pleosporales</i> Luttr. ex M.E. Barr (*)	PLE					10	41	2				1
<i>Preussia africana</i> Arenal, Platas & Peláez (*)	PAF				1	1	7				10	1
<i>Preussia australis</i> (Speg.) Arx (*)	PAU								3	4		
<i>Preussia minima</i> (Auersw.) Arx (*)							1					
<i>Preussia</i> sp. Fuckel (*)	PRE				22	9	6		32	14		3
Sarcosomataceae Kobayasi (*)							1					
<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> (Ellis & Everh.) Huhndorf (*)	SCL					4	4	1				
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	SOR						2			2	7	
<i>Sporormiella</i> sp. Ellis & Everh. (*)					1							
<i>Trichoderma saturnisporum</i> Hammill		1										
<i>Xylaria acuta</i> Peck (*)				2			1					
<i>Xylaria digitata</i> (L.) Grez. (*)		2										
<i>Xylaria enteroleuca</i> (Speg.) P.M.D. Martin (*)						1						
<i>Xylaria hypoxylon</i> (L.) Grev. (*)									1			
<i>Xylaria</i> sp. Hill ex Schrank (*)	XYL	7	11			3				2	1	
Xylariales (Amphisphaeriaceae) G. Winter (*)	XAM					11	15	23				
Xylariales (Xylariaceae) Tul. & C. Tul. (*)						4						
Micelios claros estériles	MCE			3	3		1	1	4	1		
Micelios hialinos estériles	MHE		3				1	1		1	3	
Micelios oscuros estériles	MOE		1					2			5	
Total de segmentos inoculados (1200)		100										
N° total de aislamientos (801)		74	99	110	9	51	74	105	9	77	70	92
N° total de taxa (65)		12	7	12	5	10	16	16	7	13	16	13

El código corresponde a las especies que fueron incluidas en el análisis de correspondencias.

(*) = taxa identificados mediante métodos moleculares.

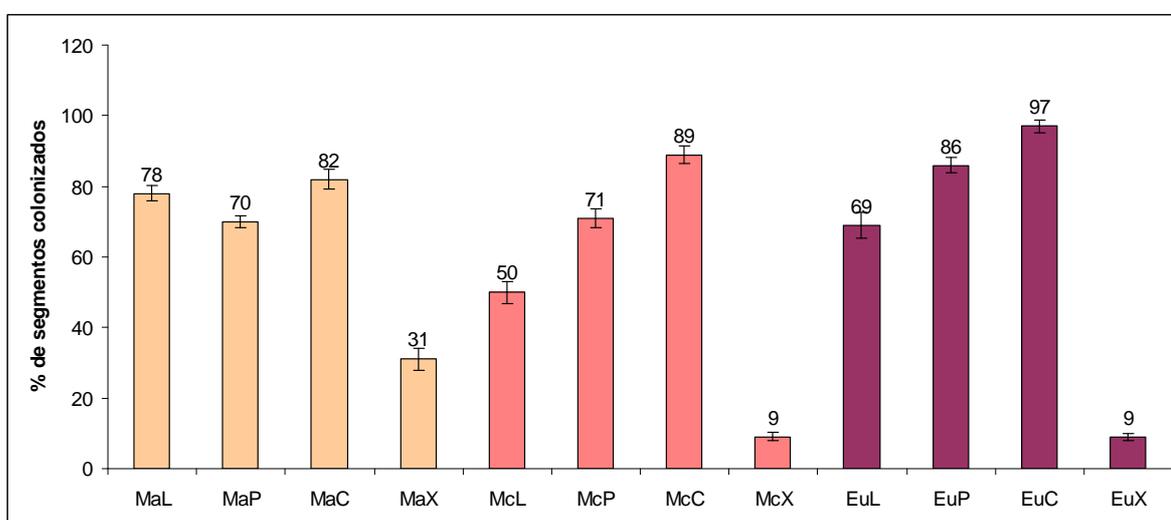
La distribución de los hongos endófitos presentes en los órganos de las tres especies de plantas se ajusta a la distribución lognormal ($P > 0,05$) según el Test de Kolmogorov-Smirnov. Pocas especies fueron aisladas con alta frecuencia y muchas fueron raras (Figura 13).

Figura 13. Ajuste al modelo de distribución log-normal (Kolmogorov-Smirnov) de la abundancia de especies para cada órgano en las tres plantas nativas



En las ramas el porcentaje de segmentos colonizados fue mayor en la corteza que en el xilema para todas las plantas, y en las hojas el pecíolo estuvo más colonizado que la lámina, excepto en *M. atropurpureum* donde la lámina presentó mayor colonización. El porcentaje de colonización varió entre 9% en xilema de *M. cisplatensis* y de *E. uruguayensis* hasta 97% en la corteza de *E. uruguayensis*. (Figura 14).

Figura 14. Porcentaje de segmentos de tejidos colonizados en *M. atropurpureum*, *M. cisplatensis* y *E. uruguayensis*



Ma: *M. atropurpureum*; Mc: *M. cisplatensis*; Eu: *E. uruguayensis*; L: lámina; P: pecíolo; C: corteza; X: xilema. Las barras representan el desvío estándar y los números corresponden al porcentaje de segmentos colonizados.

La diversidad de especies obtenida por el índice de Shannon es mayor en la lámina que en el pecíolo de *E. uruguayensis*, por el contrario, en *M. cisplatensis* la diversidad es mayor en el pecíolo que en la lámina y en *M. atropurpureum* la diversidad en ambos es similar (Tabla 6). En la corteza y el xilema la diversidad de especies es similar para cada una de las plantas estudiadas. La diversidad en las hojas y ramas es similar dentro de cada especie de planta, y la diversidad de la comunidad total de hongos endófitos en cada especie arbórea es mayor que la de los órganos por separado, siendo más diversa la comunidad de endófitos

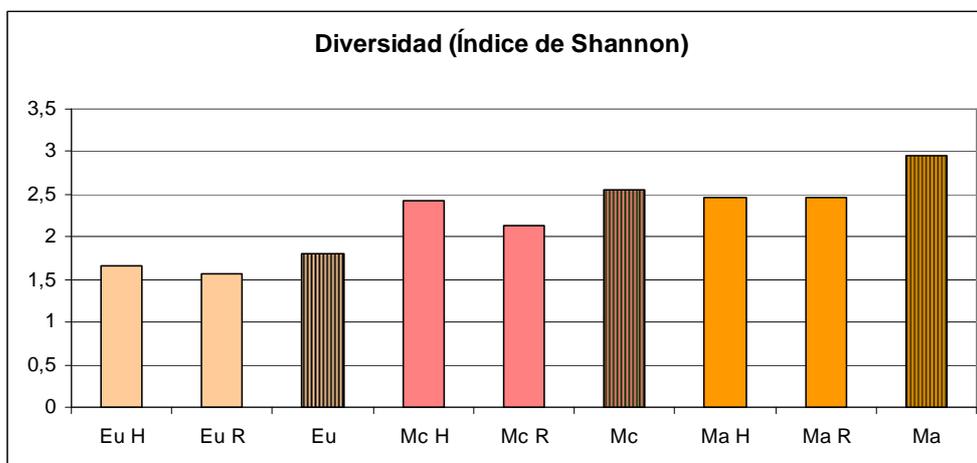
asociados a *M. atropurpureum* que la de *M. cisplatensis* y ésta a su vez más diversa que la de *E. uruguayensis* (Figura 15).

Tabla 6. Índice de diversidad de Shannon para órganos y tejidos de *E. uruguayensis*, *M. cisplatensis* y *M. atropurpureum*

<i>E. uruguayensis</i>							
	Eu L	Eu P	Eu H	Eu C	Eu X	Eu R	Eu
Diversidad (H')	2,003	0,838	1,653	1,279	1,465	1,561	1,807
Uniformidad (J)	0,806	0,468	0,61	0,515	0,91	0,551	0,542
Num.Esp. (S)	12	6	15	12	5	17	29
<i>M. cisplatensis</i>							
	Mc L	Mc P	Mc H	Mc C	Mc X	Mc R	Mc
Diversidad (H')	1,697	2,386	2,425	2,003	1,889	2,133	2,559
Uniformidad (J)	0,737	0,86	0,809	0,722	0,971	0,738	0,752
Num.Esp. (S)	10	16	20	16	7	18	30
<i>M. atropurpureum</i>							
	Ma L	Ma P	Ma H	Ma C	Ma X	Ma R	Ma
Diversidad (H')	2,004	2,397	2,452	1,887	2,207	2,466	2,949
Uniformidad (J)	0,781	0,865	0,818	0,736	0,86	0,776	0,823
Num.Esp. (S)	13	16	20	13	13	24	36

Eu: *E. uruguayensis*, Mc: *M. cisplatensis*, Ma: *M. atropurpureum*, L: lámina, P: peciolo, H: hoja, C: corteza, X: xilema, R: rama.

Figura 15. Diversidad en las tres plantas estudiadas



Eu: *E. uruguayensis*, Mc: *M. cisplatensis*, Ma: *M. atropurpureum*, H: hoja, R: rama.

Los Análisis de Correspondencias se realizaron utilizando las 20 especies, que fueron aisladas en más de un tejido y con una frecuencia igual o mayor al 5%. Se sumaron los micelios estériles (ME) y los datos fueron transformados con Log+1. Se realizaron 3 análisis uno para evaluar los ensamblajes fúngicos en relación con cada especie de planta hospedera, otro para caracterizar los ensamblajes de los órganos (hoja y rama) de cada especie de planta y finalmente otro para determinar los ensamblajes fúngicos característicos de todos los tejidos de cada planta.

El Análisis para evaluar los ensamblajes fúngicos en las tres especies de plantas (Figura 16), mostró que los 2 primeros ejes explican el 100% de la varianza total indicando un perfecto ajuste de los datos con el modelo. El eje 1 explica el 60,54% de la varianza y separa los ensamblajes fúngicos de *E. uruguayensis* de los de *M. atropurpureum* y de *M. cisplatensis*. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, *Phomopsis* spp. (Sacc) Bubák y *Xylaria* sp. Hill ex Schrank, contribuyen con 49% a la inercia en dicho eje y colonizan con alta frecuencia los tejidos de *E. uruguayensis*. El eje 2 contribuye con el 39,46% y separa los ensamblajes fúngicos de *M. atropurpureum* y de *M. cisplatensis*. Los hongos, Pleosporales, Xylariales (Amphisphaeriaceae) y *Sclerostagonospora opuntiae* (Ellis & Everh.) Huhndorf se asocian fundamentalmente (casi exclusivamente) con *M. cisplatensis* y contribuyen con el 32% a la inercia del eje. Por otro lado, las especies *M. pestalozzoides*, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud y *Preussia australis* (Speg.) Arx, colonizaron únicamente los tejidos de *M. atropurpureum*, aportando estas especies el 32,3% en la construcción de este eje.

En el análisis de correspondencias realizado para determinar la asociación de las especies fúngicas con los órganos (hoja y rama) de cada una de las especies de plantas (Figura 17), se obtuvo que los tres primeros ejes explican el 88,12% de la inercia total indicando un muy buen ajuste al modelo. En este análisis no se observa en general una separación de los ensamblajes fúngicos por órgano y si se separan por especie de planta. El eje 1 aporta el 42,7% y separa las especies

fúngicas asociadas a ramas y hojas de *M. cisplatensis* de las ramas y hojas de *E. uruguayensis*.

Phomopsis sp. y *C. gloesporioides* caracterizan hojas y ramas de *E. uruguayensis* aportando el 58,1% de la inercia de dicho eje. El eje 2 explica el 25% de la varianza total y separa los ensambles fúngicos de hojas y ramas de *M. cisplatensis* de las hojas y ramas de *M. atropurpureum*. *M. pestalozzoides* aporta el 24% a la inercia del eje y coloniza fundamentalmente las ramas de *M. atropurpureum*, mientras que Pleosporales y Xylariales (Amphisphaeriaceae) son colonizadores frecuentes de hojas y ramas de *M. cisplatensis* y aportan juntas el 39% en la construcción de este eje (Figura 17). El eje 3 contribuye con el 20,3% y separa los ensambles fúngicos de las hojas de *M. atropurpureum* de los de las ramas. *Guignardia mangiferae* A.J. Roy, *M. pestalozzoides*, *Preussia africana* Arenal, Platas & Peláez y *Preussia* sp. contribuyen con el 52,6% a la construcción de dicho eje, caracterizando *G. mangiferae* y *Preussia* sp. a las hojas y *M. pestalozzoides* y *P. africana* a las ramas (Figura 18).

El tercer Análisis de Correspondencias fue elaborado para evaluar las especies que estaban asociadas a cada tejido, órgano y especie de planta. Los tres primeros ejes explican el 66,2% de la inercia total, indicando un buen ajuste de los datos al modelo (Figura 19). El eje 1 contribuye con el 30,24% a la inercia total y separa los tejidos de *E. uruguayensis*, de los tejidos de *M. cisplatensis*, fundamentalmente la corteza. *C. gloesporioides*, *Phomopsis* sp. y *Preussia* sp. contribuyen con el 76,2% de a la construcción de éste eje. *C. gloesporioides* y *Phomopsis* sp. caracterizan a hojas y ramas de *E. uruguayensis*, mientras que *Preussia* sp. caracteriza las hojas y ramas de *M. cisplatensis* y *M. atropurpureum*.

El eje 2 aporta el 19,8% y separa fundamentalmente los ensambles fúngicos de la corteza de *M. cisplatensis* de los de la corteza de *M. atropurpureum*. *M. pestalozzoides*, Xylariales (Amphisphaeriaceae) y Pleosporales aportan el 54,9% a la inercia del eje, la primer especie colonizó únicamente los tejidos de

M. atropurpureum, fundamentalmente la corteza, y las dos últimas caracterizan la corteza de *M. cisplatensis*.

La colonización del xilema en las tres especies de plantas fue muy baja, quedando agrupados en donde concurren los ejes.

Figura 16. Análisis de Correspondencias construido para las tres especies de plantas

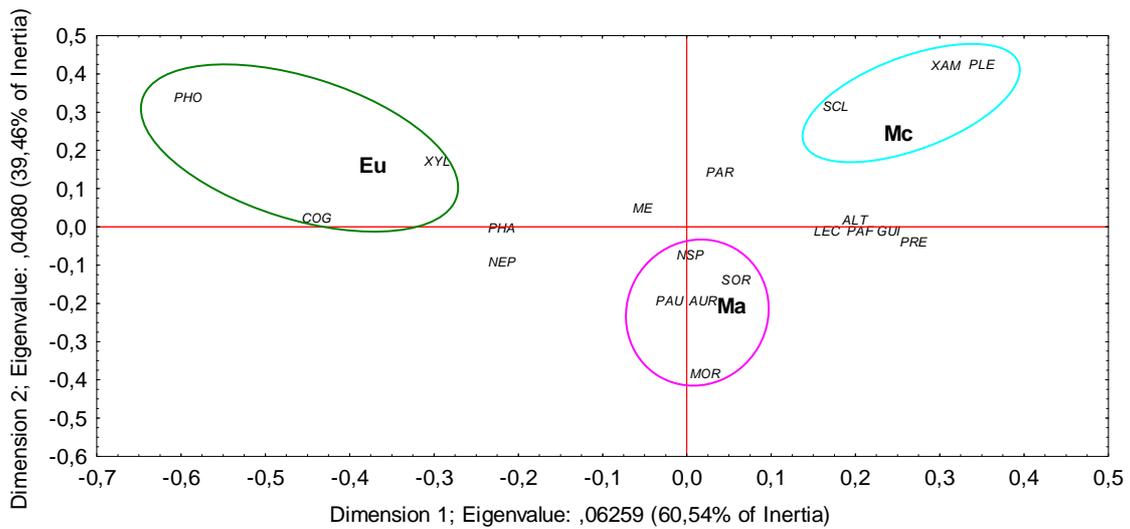


Figura 17. Análisis de Correspondencias con Órganos (Hoja y Rama) de las tres Especies de Plantas. (Ejes 1 y 2)

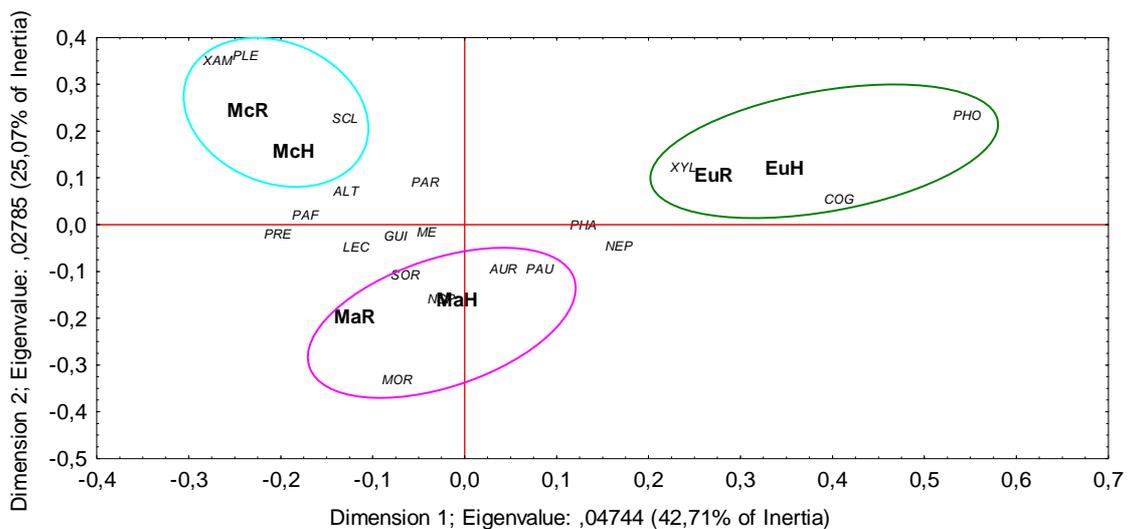


Figura 18. Análisis de Correspondencias con Órganos (Hoja y Rama) de las tres Especies de Plantas (Ejes 1 y 3)

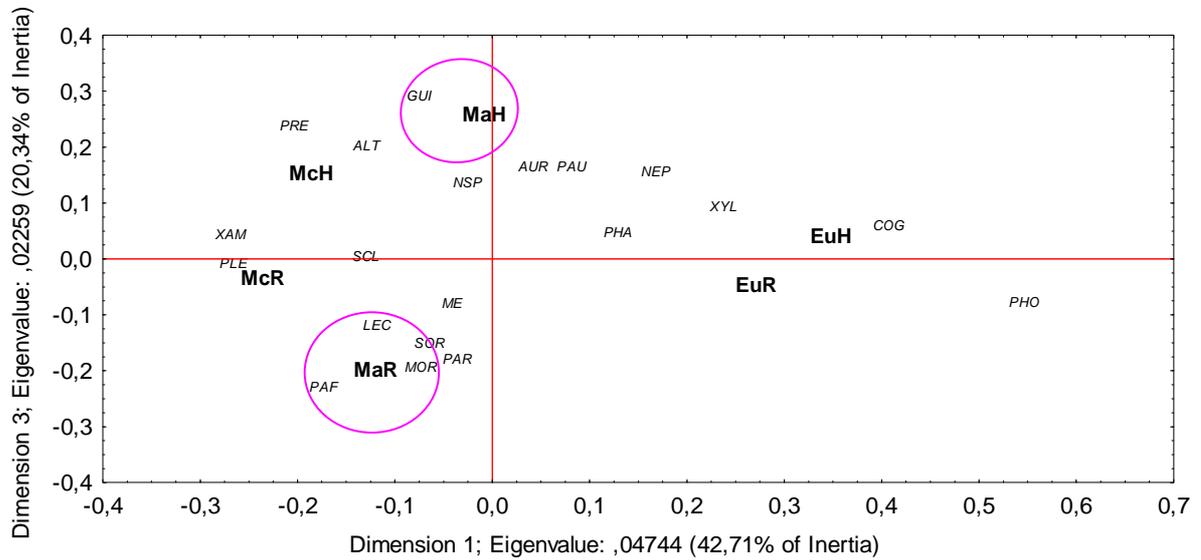
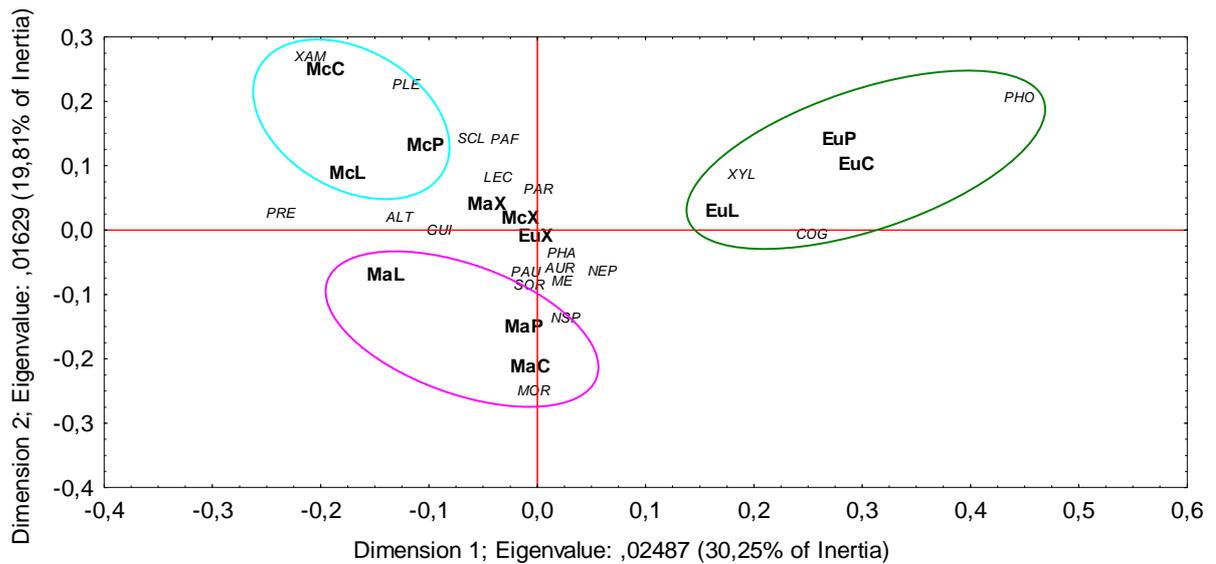


Figura 19. Análisis de Correspondencias con Tejidos, Órganos y Especies de Plantas



5.2. Evaluación de la actividad degradadora de los endófitos sobre los componentes estructurales de las plantas.

Producción de enzimas extracelulares: endocelulasas, pectinasas y ligninasas

Un elevado porcentaje (98%) de los hongos endófitos aislados produjeron halo de clareado en los medios de cultivo utilizados para la determinación de enzimas extracelulares, evidenciando actividad enzimática celulolítica (figura 20), pectinolítica (figura 21) o lignolítica (figura 22).

Figura 20. Producción de endocelulasas. Formación de halo de clareado

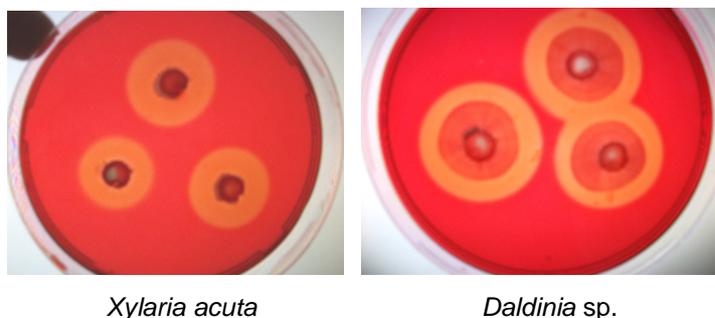


Figura 21. Producción de pectinasas. Formación de halo de clareado



Figura 22. Producción de ligninasas. Escala de clareado utilizada para la evaluación (+, ++, +++, +++++)



M. pestalozzioides (+)

Lophiostoma sp. (++)

Xylaria hypoxylon (+++)

Lentinus tigrinus (+++++)

El 44% de los aislamientos provenientes de *E. uruguayensis*, presentaron una actividad enzimática > 1 para endocelulasas, el 62% para pectinasas y el 12% de los aislamientos expresaron actividad lignolítica > ++.

De *M. cisplatensis* el 41% de los aislamientos reflejaron actividad celulolítica > 1, también el 41% presentó actividad enzimática >1 para pectinasas y el 14% de los aislamientos evidenciaron actividad lignolítica > ++.

El 57% de los hongos endófitos aislados de *M. atropurpureum* expresaron una actividad enzimática >1 para endocelulasas, el 29% para pectinasas y el 11% presentó actividad enzimática > ++ para ligninasas (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de aislamientos con actividad enzimática celulolítica, pectinolítica y lignolítica según la especie de planta hospedera

Especie de planta Hospedera	Endocelulasas (% de aisl. con AE > 1)	Pectinasas (% de aisl. con AE > 1)	Ligninasas (% de aisl. con AE +++ o +++++)
<i>E. uruguayensis</i>	44 %	62 %	12 %
<i>M. cisplatensis</i>	41 %	41 %	14 %
<i>M. atropurpureum</i>	57 %	29 %	11 %

Algunos aislamientos evidenciaron actividad enzimática para los tres grupos de enzimas, 7 provenientes de *E. uruguayensis* (21%), 15 de *M. cisplatensis* (37%) y 5 de *M. atropurpureum* (18%). Las tablas 8, 9, y 10 muestran la actividad enzimática de las diferentes especies aisladas de cada uno de los hospedantes.

Endocelulasas: Las especies presentes en *E. uruguayensis* con mayor actividad celulolítica fueron *Bartalinia robillaroides* Tassi 236 con una actividad enzimática (AE) de 2,29, *Xylaria* sp. 215 con una AE de 2,52 y *Xylaria acuta* Peck 228 con AE de 2,03 (Tabla 8). De *M. cisplatensis* las especies que presentaron mayor actividad celulolítica fueron *Paraconiothyrium fungicola* Verkley & Wicklow 142 con AE 2,92, Xylariales 143 con una AE de 2,22 y Pleosporales 141 con AE 2,18 (Tabla 9). De los aislamientos obtenidos de *M. atropurpureum* los que presentaron mayor actividad celulolítica fueron *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud 8 con AE de 3,22, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries 48 con AE 2,60, *Phomopsis* sp. 43 con AE 2,22 y *Paecilomyces variotti* Bainier 51 con AE 2,02 (Tabla 10).

Pectinasas: Las especies con mayor actividad pectinolítica provenientes de *E. uruguayensis* fueron *X. acuta* 228 con AE 1,85 y *Xylaria digitata* (L.) Grez. 225 con AE 1,73. En *M. cisplatensis* 2 aislamientos pertenecientes a Xylariales (Amphisphaeriaceae) fueron las que presentaron mayor actividad pectinolítica, el aislamiento 101' con AE 3,13 y el aislamiento 143 con AE 3,29. En *M. atropurpureum* los aislamientos que presentaron mayor actividad pectinolítica fueron *P. variotti* 51 con AE 2,03 y *Corynespora* sp. 53 con AE 2,00.

Ligninasas: Las especies que se destacaron por su capacidad de producir enzimas lignolíticas presentes en *E. uruguayensis* fueron *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. 207 (++++), *Cladosporium sphaerospermum* Penz. 240, *Lophiostoma* 246 y *X. acuta* 228 (+++). Varios aislamientos de *M. cisplatensis* mostraron una importante actividad lignolítica, destacándose *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich 159, *Neofusicoccum australe* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips 132, *Nodulisporium* sp. 125, *P. fungicola* 119, Xylariales (Xylariaceae) 120 y un micelio hialino estéril 148 (++++). Las especies con mayor actividad lignolítica en *M. atropurpureum* fueron *Xylaria* sp. 63 (++++), *Xylaria hypoxylon* (L.) Grev. 28 y *M. pestalozzoides* 34 (+++).

Tabla 8. Evaluación de la producción de enzimas extracelulares por los endófitos de *E. uruguayensis*

<i>E. uruguayensis</i>			
Aislamientos de endófitos	Endocelulasas	Pectinasas	LIGNINASAS
	AE	AE	Clareado
<i>Bartalinia robillaroides</i> 236	2,29	-	-
<i>Beltrania rombica</i> 218	1,00	1,20	++
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 239	1,47	1,67	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> 240	1,86	1,30	+++
<i>Colletotrichum gloesporioides</i> 205	1,19	1,17	-
<i>Coniochaeta velutina</i> 221	-	-	-
<i>Conoplea fusca</i> 247	1,08	-	-
<i>Daldinia</i> sp. 229	1,48	-	-
<i>Diaporthe</i> sp. 224	1,25	-	+
<i>Eupenicillium brefeldianum</i> 211'	1,34	1,54	++
<i>Glomerella cingulata</i> 223	1,00	1,14	+
<i>Lentinus tigrinus</i> 207	0,88	-	++++
<i>Lophiostoma</i> 246	1,91	1,25	+++
<i>Metarhizium anisopliae</i> 238	-	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i> 205'	-	1,00	+
<i>Neofusicoccum parvum</i> 212	0,67	1,00	-
<i>Nigrospora sacchari</i> 201	0,89	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i> 216	0,83	-	-
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> 231	1,01	1,14	-
<i>Phomopsis</i> sp. 203	1,00	1,31	-
<i>Phomopsis</i> sp. 217	-	1,31	-
<i>Phomopsis</i> sp. 214	0,79	1,18	-
<i>Phomopsis</i> sp. 204	1,00	1,12	-
<i>Phomopsis</i> sp. 206	1,08	1,60	-
<i>Phomopsis</i> sp. 213	-	1,07	-
<i>Phomopsis</i> sp. 226	-	1,08	-
<i>Phomopsis</i> sp. 219	0,69	1,33	-
" <i>Phomopsis micheliae</i> " 202	-	1,08	-
<i>Trichoderma saturnisporum</i> 210	0,59	1,31	-
<i>Xylaria acuta</i> 228	2,03	1,85	+++
<i>Xylaria digitata</i> 225	1,63	1,73	+
<i>Xylaria</i> sp. 215	2,52	1,00	-
<i>Micelio estéril</i> 233	1,00	1,11	-
<i>Micelio estéril</i> 235	1,22	-	-

Tabla 9. Evaluación de la producción de enzimas extracelulares por los endófitos de *M. cisplatis*

<i>M. cisplatis</i>				
Aislamientos de endófitos		Celulasas	Pectinasas	LIGNINASAS
		AE	AE	Clareado
<i>Alternaria alternata</i>	101	1,17	1,05	-
Ascomycota	146	-	1,82	++
Ascomycota	150	1,00	-	-
<i>Guignardia mangiferae</i>	116	-	-	+++
<i>Lecytophora fasciculata</i>	121	1,33	1,54	++
<i>Myrothecium verrucaria</i>	152	1,42	-	-
<i>Neofusicoccum australe</i>	132	0,68	1,07	++++
<i>Nigrospora sphaerica</i>	113	0,78	1,12	-
<i>Nodulisporium sp.</i>	125	1,35	-	++++
<i>Paraconiothyrium fungicola</i>	142	2,92	1,00	++
<i>Paraconiothyrium fungicola</i>	119	1,18	1,63	++++
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	104	0,91	1,09	+++
<i>Peyronellaea australis</i>	128	-	1,00	+
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	159	1,00	1,00	++++
<i>Phomopsis sp.</i>	123	1,33	1,30	-
Pleosporales	141	2,18	-	++
Pleosporales	149	1,84	1,00	++
Pleosporales	126	1,00	1,46	+++
<i>Preussia africana</i>	105	1,50	-	-
<i>Preussia africana</i>	136	0,63	1,00	+++
<i>Preussia minima</i>	154	0,72	-	++
<i>Preussia sp.</i>	100	1,00	-	+++
<i>Preussia sp.</i>	102	1,00	-	-
<i>Preussia sp.</i>	103	0,75	-	-
<i>Preussia sp.</i>	124	0,61	-	++
Sarcosomataceous endophyte	155	0,92	0,83	-
<i>Sclerostagonospora opuntiae</i>	115	1,00	1,42	++
<i>Sordaria fimicola</i>	135	1,00	-	-
<i>Sporormiella sp.</i>	108	-	-	+++
<i>Xylaria acuta</i>	151	1,00	1,11	-
<i>Xylaria enteroleuca</i>	134	1,35	-	++
<i>Xylaria sp.</i>	122	1,33	1,82	++
Xylariales (Amphisphaeriaceae)	101	1,00	3,13	+
Xylariales (Amphisphaeriaceae)	110	1,88	1,96	-
Xylariales (Amphisphaeriaceae)	143	2,22	3,29	++
Xylariales (Xylariaceae)	120	-	1,61	++++
Xylariales (Xylariaceae)	133	1,00	1,05	+++
Micelio claro estéril	153	1,06	-	+++
Micelio claro estéril	160	-	-	++
Micelio hialino estéril	148	1,22	1,00	++++
Micelio oscuro estéril	156	1,33	1,00	-

Tabla 10. Evaluación de la producción de enzimas extracelulares por los endófitos de *M. atropurpureum*

<i>M. atropurpureum</i>			
Aislamientos de endófitos	Celulasas	Pectinasas	LIGNINASAS
	AE	AE	Clareado
<i>Alternaria alternata</i> 5	1,06	1,12	++
<i>Anthostomella eucalyptorum</i> 25	1,22	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> 8	3,22	1,41	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> 48	2,60	1,00	-
<i>Colletotrichum acutatum</i> 50	1,66	1,49	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 1'	1,13	1,15	-
<i>Corynespora</i> sp. 53	-	2,00	++
<i>Epicoccum purpurascens</i> 45	1,06	-	-
<i>Gelasinospora retispora</i> 38	1,00	1,00	+
<i>Lechytophora</i> sp. 55	1,20	-	++
<i>Lophiostoma</i> sp. 57	1,00	-	++
<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> 56	1,69	1,26	-
<i>Morinia pestalozzoides</i> 34	1,85	-	+++
<i>Neofusicoccum parvum</i> 12	-	-	+
<i>Nigrospora sphaerica</i> 4	1,08	-	-
<i>Nodulisporium</i> sp. 18	1,00	-	+
<i>Paecilomyces variotti</i> 51	2,02	2,03	-
<i>Peziza varia</i> 58	0,92	-	-
<i>Phaeoacremonium</i> sp. 20	1,26	1,00	+
<i>Phoma glomerata</i> 13	0,98	1,04	+
<i>Phomopsis</i> sp. 21	1,72	-	++
<i>Phomopsis</i> sp. 43	2,22	-	-
<i>Preussia africana</i> 33	1,00	-	-
<i>Preussia australis</i> 2	1,00	-	-
<i>Sordaria fimicola</i> 37	0,70	1,00	++
<i>Xylaria hypoxylon</i> 28	-	1,00	+++
<i>Xylaria</i> sp. 63	1,07	-	++++
Micelio oscuro estéril 40	-	-	+

Los 4 aislamientos, *Phomopsis* sp. 217, 213 , 226 y "*Phomopsis micheliae*" C.Q. Chang, Z.D. Jiang & P.K. Chi 202, obtenidos de *E. uruguayensis*, presentaron solamente actividad enzimática para pectinasas.

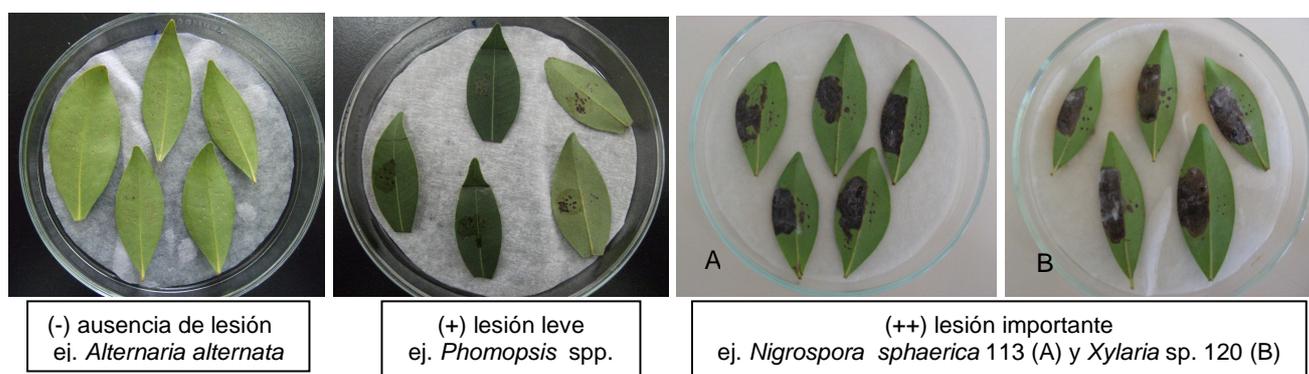
El hongo entomopatígeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn no presentó actividad para ninguno de los 3 complejos enzimaticos evaluados.

5.3. Evaluación de la capacidad de producir metabolitos fitotóxicos

De los extractos obtenidos a partir de 28 aislamientos de hongos endófitos seleccionados para la evaluación de fitotoxicidad, se encontraron 9 con capacidad de provocar necrosis en las hojas de *E. uruguayensis*.

Las lesiones producidas fueron de diferente intensidad, clasificándose como leves (+), e importantes (++), y en caso de no producirse lesión como (-) (Figura 23).

Figura 23. Efecto de los metabolitos sobre las hojas de *E. uruguayensis*



Solamente 2 extractos produjeron lesiones importantes (++) en las hojas, estos corresponden a *N. sphaerica* 113 y *Xylaria* sp. 120, ambos fueron aislados de *M. cisplatensis*. *Xylaria* sp. 120 también produjo clorosis en el segmento de hoja sembrado sobre agar malta cuando el micelio emergía.

Los extractos correspondientes a 7 aislamientos produjeron lesiones leves (+) y los restantes 19 no produjeron lesión en las hojas (-) (Tabla 11).

Tabla 11. Evaluación de fitotoxicidad de los extractos obtenidos a partir de los hongos endófitos sobre hojas de *E. uruguayensis*

Aislamientos Cepas de hongos	Origen		Fitotoxicidad
	Planta	Órgano	Presencia de lesión
<i>Alternaria alternata</i> 101	Mc	hoja	-
<i>Alternaria alternata</i> 47	Ma	xilema	-
<i>Colletotrichum acutatum</i> 50	Ma	xilema	+
<i>Colletotrichum gloesporioides</i> 1'	Ma	pecíolo	-
<i>Colletotrichum gloesporioides</i> 205	Eu	hoja	-
<i>Diaporthe</i> sp. 224	Eu	pecíolo	+
<i>Glomerella cingulata</i> 223	Eu	hoja	-
<i>Guignardia mangiferae</i> 116	Mc	pecíolo	+
<i>Neofusicoccum australe</i> 132	Mc	pecíolo	+
<i>Neofusicoccum parvum</i> 12	Ma	pecíolo	-
<i>Neofusicoccum parvum</i> 205'	Eu	hoja	-
<i>Neofusicoccum parvum</i> 212	Eu	hoja	+
<i>Nigrospora sphaerica</i> 113	Mc	pecíolo	++
<i>Phaeoacremonium</i> sp. 20	Ma	pecíolo	+
<i>Phaeoacremonium</i> sp. 243	Eu	Xilema	-
" <i>Phomopsis micheliae</i> " 202	Eu	hoja	-
<i>Phomopsis</i> sp. 203	Eu	hoja	-
<i>Phomopsis</i> sp. 204	Eu	hoja	-
<i>Phomopsis</i> sp. 206	Eu	hoja	+
<i>Phomopsis</i> sp. 21	Ma	hoja	-
<i>Phomopsis</i> sp. 213	Eu	pecíolo	-
<i>Phomopsis</i> sp. 214	Eu	pecíolo	-
<i>Phomopsis</i> sp. 217	Eu	pecíolo	-
<i>Phomopsis</i> sp. 219	Eu	pecíolo	-
<i>Phomopsis</i> sp. 226	Eu	corteza	-
<i>Preussia</i> sp. 100	Mc	hoja	-
<i>Xylaria digitata</i> 225	Eu	hoja	-
<i>Xylaria</i> sp.120	Mc	hoja	++
Xylariales (Amphisphaeriaceae) 110	Mc	pecíolo	-

(-) No produce lesión

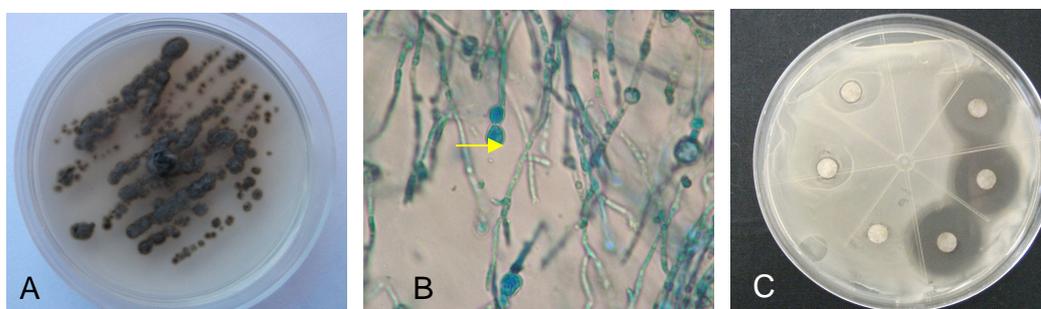
(+) Lesión muy leve alrededor de las pinchaduras

(++) Lesión importante en toda la zona aplicada

5.4. Evaluación de la capacidad antagónica. Producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana

De los 19 aislamientos seleccionados 16 fueron capaces de producir metabolitos con capacidad inhibitoria frente a, al menos, un organismo. La mayoría de los aislamientos produjeron metabolitos con capacidad inhibitoria frente a bacterias, mientras que solamente 4 aislamientos mostraron inhibición frente a algún hongo. Un solo aislamiento, *Lophiostoma* sp. (246), que presentó 99% de similitud en las secuencias LSU con *Lophiostoma hysterooides* (Anexo 1), produjo metabolitos capaces de inhibir a todos los organismos enfrentados, mostrando el mayor halo de inhibición frente a *S. aureus* (10mm) (Figura 24), seguido por *C. gloeosporioides* (205) con un halo de 5mm. También *S. opuntiae* (145) y *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (101) con halos de 3mm y de 2,5mm respectivamente, presentaron buena actividad inhibitoria frente al patógeno humano *S. aureus*. Por otro lado, los aislamientos de *P. africana* 33 y 33' presentaron actividad frente a la bacteria fitopatógena *X. campestris* (halos de 2mm y 3,5mm respectivamente). La inhibición producida por los metabolitos fúngicos fue pequeña en comparación con la producida por la ampicilina (0,2g/ml) frente a las bacterias y con la de ketoconazol (2%) frente a los hongos (Tabla 12). En cuanto a la toxicidad de los metabolitos producidos por los hongos endófitos, se observó que todos los aislamientos estudiados presentaron toxicidad leve, excepto *S. opuntiae* (115') que no presentó toxicidad frente a *A. salina*.

Figura 24. *Lophiostoma* sp. (aislamiento 246)



A) aspecto macroscópico del crecimiento en agar-malta, B) aspecto microscópico, micelio y clamidosporas (flecha), C) halos de inhibición producido por los metabolitos de este hongo frente a *S. aureus*.

Tabla 12. Medidas de los halos de inhibición del crecimiento microbiano (mm) producidos por los metabolitos fúngicos extraídos y toxicidad de los mismos sobre *Artemia salina*

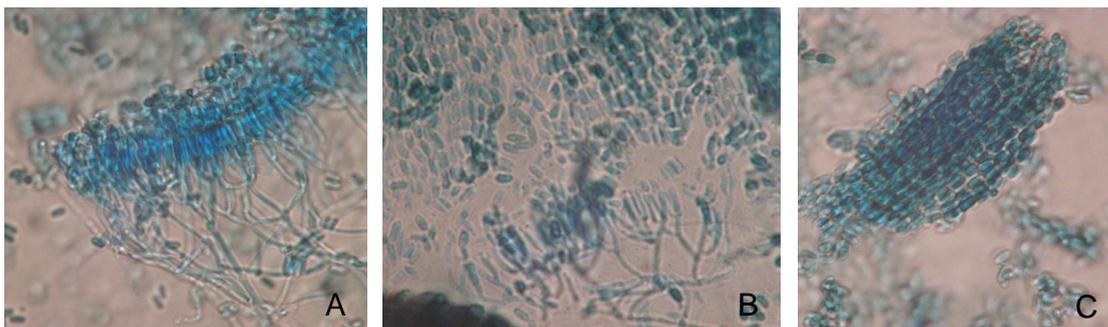
METABOLITOS	Bacterias				Hongos				Toxicidad (a) (<i>Artemia salina</i>)
	<i>Es co</i>	<i>St au</i>	<i>Xa ca</i>	<i>Er ca</i>	<i>Ca al</i>	<i>Co gl</i>	<i>As fu</i>	<i>Fu ox</i>	
<i>Alternaria alternata</i> 101	-	2,5	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 205	-	5	0,5	-	-	-	-	-	LT
<i>Coniochaeta velutina</i> 221	0,5	1	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Daldinia</i> sp. 241	0,5	0,5	-	-	-	-	-	1	LT
<i>Lentinus tigrinus</i> 207	-	-	1	-	-	-	-	-	LT
<i>Lophiostoma</i> sp. 246	1	10	1	1	2,5	2	2	1	LT
Micelio estéril 235	-	-	0,5	-	1	-	-	-	LT
<i>Morinia pestalozzoides</i> 34	-	-	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> 104	-	1,5	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> 104'	-	-	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Phomopsis</i> sp. 203	-	0,5 - 1	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Phomopsis</i> sp. 21	-	-	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Preussia africana</i> 33	1	1	2	-	-	-	-	-	LT
<i>Preussia africana</i> 33'	1	1	3,5	-	-	-	-	-	LT
<i>Preussia australis</i> 17	1	0,5 - 1	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> 115	-	1	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> 115'	-	-	-	-	1	-	-	-	NT
<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> 145	-	3	-	-	-	-	-	-	LT
<i>Xylaria digitata</i> 225	-	-	-	0,5	-	-	-	-	LT
Control negativo (acetona)	-	-	-	-	-	-	-	-	
Control positivo para bacterias (Ampicilina 0,2g/ml)	15	37	15	29					
Control positivo para hongos (Ketoconazol 2%)					14	10	8	3	

(a) = Toxicidad en *A. salina*, según el % de mortalidad corregido (% de sobrevivientes en el blanco - % de sobrevivientes en los tratamientos). 0 - 9% = No Tóxico (NT), 10 – 49% = Levemente Tóxico (LT), 50 – 89% = Tóxico (T), 90 - 100% = Muy Tóxico (MT)

5.5. Evaluación de la capacidad entomopatogénica de endófitos.

Se obtuvo un aislamiento de *M. anisopliae* (Figura 25) en xilema de *E. uruguayensis*.

Figura 25. *Metarhizium anisopliae* (aislamiento 238)



Se observan detalles de: A) Esporodocio, B) Conidióforos, y C) Conidios

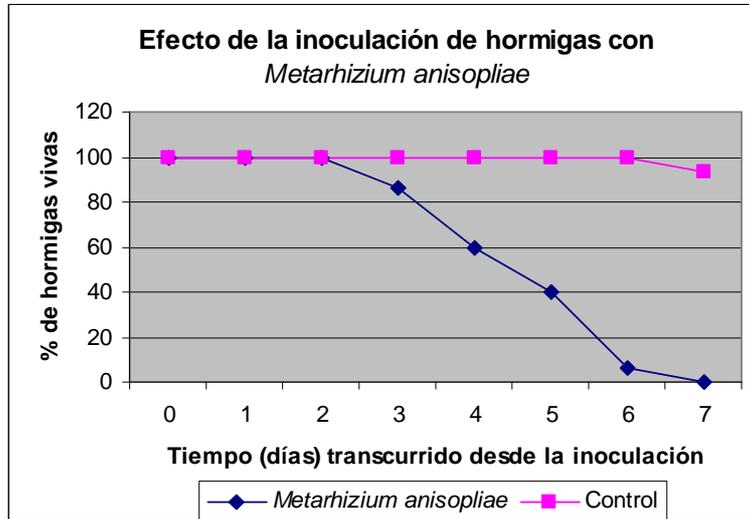
5.5.1. Evaluación de la capacidad patogénica frente a hormigas:

La cepa de *M. anisopliae* aislada presentó una importante capacidad entomopatogénica frente a hormigas de la especie *A. lundii* en las evaluaciones realizadas en laboratorio.

Se produjo una rápida y exitosa infección de las hormigas a partir de esporas, y las primeras muertes se produjeron a los 3 días posteriores a la inoculación de las mismas, provocando el 100% de mortalidad de las hormigas infectadas en 7 días (Figura 26).

En las hormigas sin inocular, usadas como control, se registró sólo una muerte a los 7 días.

Figura 26. Mortalidad de hormigas *A. lundii* provocada por la inoculación con *M. anisopliae*.



En las hormigas muertas se observó micelio de *M. anisopliae* emergiendo de las articulaciones, donde además se produjo la esporulación (Figura 27). A partir de ellas se realsió *M. anisopliae* confirmándose este hongo como el agente causal de la muerte de las hormigas.

Figura 27. Emergencia de micelio de *M. anisopliae* en hormigas muertas



5.5.2. Caracterización enzimática: determinación de proteasas y quitinasas

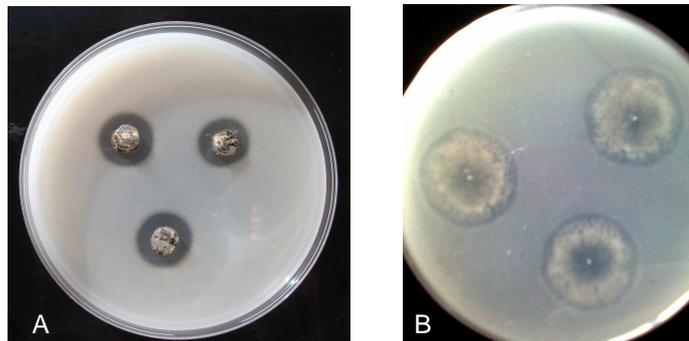
La tabla 13 muestra la caracterización enzimática de la cepa de *M. anisopliae* aislada como endófito. Se observó una actividad enzimática (AE) importante para proteasas y quitinasas (Figura 28).

Las proteasas se produjeron rápidamente, observándose los halos de clareado a las 48 hs (AE = 1,86). En cambio, para quitinasas los halos se produjeron a los 7 días de incubación, observándose una actividad enzimática mayor a los 14 días (AE = 1,16).

Tabla 13. Actividad enzimática proteolítica y quitinolítica de *M. anisopliae*

Aislamiento	Tiempo de incubación (días)	Proteasas (AE)	Quitinasas (AE)
<i>Metarhizium anisopliae</i> 238	2	1,86	-
	7	1,28	1,11
	14	-	1,16

Figura 28. Se observan halos de clareado alrededor del micelio de *M. anisopliae*, indicando actividad enzimática para proteasas (A) y para quitinasas (B)



6. DISCUSIÓN

El estudio de los hongos endófitos se realizó mediante la técnica de aislamiento de microorganismos a partir de fragmentos de órganos y tejidos de plantas desinfectados superficialmente e inoculados en agar. Si bien esta técnica de cultivo de los organismos permite la detección de una parte de la composición y riqueza específica de la comunidad fúngica, la importancia del cultivo se ve reforzada para realizar estudios de producción de metabolitos secundarios con bioactividad, producción de toxinas, actividad enzimática, preferencia por hospedero e interacciones entre organismos (Unterseher & Schnittler 2009). Es por ello que se empleó esta metodología tradicional de aislamiento y cultivo de los hongos endófitos, aceptando que la biodiversidad de los hongos aislados es menor que la realmente presente en las comunidades endofíticas de las plantas (Hyde & Soyong 2008).

Se utilizó el concepto de morfotipo (Bills 1996) para el agrupamiento de unidades taxonómicas dado que un número importante de aislamientos permanecieron estériles al final del estudio dificultando su identificación.

Las curvas de abundancia relativa de especies mostraron que la mayor parte de los hongos endófitos presentes en ramas y hojas de las plantas nativas *E. uruguayensis*, *M. cisplatensis* y *M. atropurpureum* fueron recuperados con este método de aislamiento cuando se inocularon entre 60 y 90 segmentos, variando en los diferentes tejidos. Esto indicó que 100 segmentos de cada tejido fueron suficientes para representar la comunidad fúngica presente en ellos y por lo tanto, el esfuerzo de muestreo fue adecuado.

Las especies dominantes en la comunidad endofítica, y que estuvieron presentes en las 3 especies de plantas fueron *Phomopsis* spp., *Xylaria* sp. y *N. sphaerica*, estas especies son comúnmente aisladas como endófitos.

Hydde & Soyong (2008) citan a *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp., y *Xylaria* sp. como hongos endófitos típicos, con rápido crecimiento en medio de cultivo.

La composición de la comunidad fúngica fue diferente en las tres especies de plantas lo que podría indicar que existe preferencia de los hongos por especie hospedera. Algunos estudios previos muestran que las comunidades de hongos endófitos son influenciadas por sus hospederos, por ejemplo Arnold *et al.* (2001) concluye que los hongos endófitos se separan de acuerdo con la especie hospedera. Sun *et al.* (2008) por su parte mostraron que la composición de endófitos era diferente en 6 plantas medicinales y Kernaghan & Patriquin (2011) indicaron que los hongos endófitos en raíces de árboles boreales forman ensamblajes diferentes en los distintos hospedantes.

Fundamentalmente se diferenció la comunidad fúngica asociada a *E. uruguayensis*, con 14 taxa exclusivos y 14 compartidos con las otras plantas. Esta planta además se caracteriza por crecer en monte ribereño, donde se realizó el muestreo de la misma, mientras que el muestreo de las otras 2 especies de plantas se realizó en monte serrano. Por lo tanto, además de la especie, esta variable pudo haber influido en la diferente composición de la comunidad endofítica de *E. uruguayensis*. Las especies dominantes en esta planta fueron *C. gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. y *Xylaria* sp., no siendo ninguna de ellas exclusiva.

Dentro del género *Colletotrichum* se encuentran tanto patógenos habituales, como endófitos foliares de numerosas plantas terrestres habiéndose registrado su presencia en más de 2200 plantas (Farr & Rossman 2009).

El género ha sido tema de numerosos estudios que tienen que ver principalmente con su papel como patógeno de plantas (Bailey & Jeger 1992 y Cannon *et al.* 2008), pero es también un endófito foliar con un amplio espectro de hospedantes (Lodge *et al.* 1996, Cannon y Simmons 2002, Gamboa y Bayman 2001, Lu *et al.* 2004, Duran *et al.* 2005, Morakotkarn *et al.* 2007, Osono 2008). En Uruguay *C.*

gloeosporioides fue aislado como endófito en plantas de *Eucalyptus* spp. (Bettucci *et al.* 1999).

Como agentes patógenos de plantas, *Colletotrichum* spp. pueden causar antracnosis, podredumbre de frutos pre- y post- cosecha, damping-off y enfermedades de flor y plantas de semillero (Bailey y Jeger 1992). Este hongo es un descomponedor frecuente de los tejidos de frutos indehiscentes, participando en la degradación de los mismos y facilitando la liberación de las semillas.

Por otro lado, se ha observado que *C. gloeosporioides* aislado frecuentemente como endófito en hojas de *Theobroma cacao* confiere beneficios a la planta, por ejemplo, reduciendo la incidencia de enfermedad producida por *Phytophthora palmivora* (Mejía *et al.* 2008). Rojas *et al.* (2010) estudiaron *Colletotrichum* spp. presentes en plantas de *Theobroma cacao* y compararon aislamientos obtenidos a partir de síntomas con los aislamientos endofíticos, encontrando diferencias a nivel molecular que permitieron separarlos en grupos diferentes.

A su vez *C. gloeosporioides* ha sido encontrado como endófito y también como saprófito en *Magnolia lilifera* (Promputtha *et al.* 2007), y los análisis de secuencias sugieren que existe una íntima asociación filogenética entre los aislamientos endofíticos y los saprofiticos. Lo mismo ocurre con el teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld & Schrenk. Esta asociación filogenética entre especies endofíticas y saprofiticas indica que los aislamientos pueden tener similar origen y que tienen la habilidad de cambiar su estrategia ecológica durante la senescencia de los tejidos del hospedero.

Los aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos en este estudio no produjeron metabolitos fitotóxicos, en cambio el aislamiento de *C. acutatum* produjo una lesión leve solamente en torno a las heridas realizadas en las hojas. En cuanto a la capacidad de producir enzimas se observó que estos aislamientos presentaron actividad pectinolítica y celulolítica importantes para la degradación de los componentes de los tejidos vegetales. Estas características indicarían que los aislamientos de *Colloetotrichum* spp. obtenidos de las plantas nativas tendrían una estrategia de vida endofítica y saprofitica.

Arivudainambi *et al.* (2011) aislaron *C. gloeosporioides* de la planta medicinal *Vitex negundo*, y los extractos obtenidos a partir de este hongo en cultivo exhibieron actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos, inhibiendo cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, penicilina y vancomicina.

El extracto obtenido a partir del cultivo de *C. gloeosporioides* 205 aislado de *E. uruguayensis* presentó actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y también, aunque muy leve, frente *Xanthomonas axonopodis*. Esto confirma que esta especie aislada como endófito en numerosas plantas es capaz de producir metabolitos con bioactividad, y podría ser considerada como “especie creativa”, tal como Dreyfuss y Chapela (1994) consideraron a los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* basándose en la producción de numerosos metabolitos bioactivos.

El género *Phomopsis* (Sacc.) Bubák, es anamorfo de *Diaporthe* Nitschke y contiene taxa importantes desde el punto de vista fitopatológico, con un extenso rango de hospederos y amplia distribución geográfica (Uecker 1988; Crous & Groenewald 2005; Rossman *et al.* 2007). *Diaporthe* / *Phomopsis* constituyen un complejo fúngico con alta diversidad genética. El estudio de las especies de *Diaporthe* fitopatógenas es muy importante por su capacidad de producir enfermedades en diferentes plantas, por ejemplo en vid, girasol, soja y varias enfermedades asociadas a frutos y árboles ornamentales. Se han encontrado además especies de *Diaporthe* como endófitos en ramas y hojas sanas, y como saprófitos en hojarasca y restos de madera (Udayanga *et al.* 2011). *Phomopsis* spp. es comúnmente aislado como endófito en plantas de zonas tropicales y templadas. Promputtha *et al.* (2005) encontraron que la mayoría de los aislamientos endofíticos de *M. liliifera* correspondían al género *Phomopsis*, muchos de estos fueron aislados como morfoespecies de endófitos que permanecieron estériles siendo identificados por métodos moleculares. Además estuvo presente como saprófito y los estudios filogenéticos mostraron una estrecha asociación entre los aislamientos endofíticos y saprofíticos, indicando que podrían ser las mismas especies.

En este trabajo, 9 de los 12 aislamientos del complejo *Diaporthe/Phomopsis* presentaron actividad enzimática celulolítica y pectinolítica, 2 de ellos además presentaron actividad ligninolítica, reflejando la capacidad de degradar compuestos estructurales de las plantas y la capacidad de crecer en forma saprofítica. Pero 4 aislamientos (*Phomopsis* sp. 217, 213 y 226 y "*Phomopsis micheliae*" 202) presentaron solamente actividad enzimática para pectinasas y no para celulasas ni ligninasas, lo que llevaría a pensar que esos aislamientos podrían ser patógenos latentes caracterizados por producir pectinasas y proteinasas (Brett 1990b, Choi *et al.* 2005); pero sin embargo ninguno de estos 4 aislamientos produjeron metabolitos fitotóxicos, por lo tanto no se puede concluir sobre su posible patogenicidad con los estudios realizados.

También, algunas especies de *Phomopsis* son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana (Horn *et al.* 1995). El aislamiento de *Phomopsis* 203, obtenido de *E. uruguayensis* presentó actividad inhibitoria muy leve frente a *S. aureus* mientras que *Phomopsis* 21, aislado de *M. atropurpureum*, no presentó actividad inhibitoria frente a ninguno de los microorganismos estudiados. Por otro lado, ninguno de los aislamientos de *Phomopsis* spp. obtenidos a partir de flores y frutos de *E. uruguayensis* presentaron actividad inhibitoria frente a las mismas especies de bacterias y hongos estudiados (Ruiz 2012).

Xylaria, el otro género muy frecuente en estas Myrtaceae, se encuentra presente como endófito en casi todas las plantas tropicales y en menor medida en los árboles de zonas templadas (Bayman *et al.* 1998; Dreyfuss & Petrini 1984; Rodrigues *et al.* 1993; Fisher & Petrini 1990; Petrini & Petrini 1985; Boddy & Griffith 1989). Las especies encontradas con mayor frecuencia no son las mismas que las encontradas en otras plantas nativas pertenecientes a la familia Myrtaceae en Uruguay (Bettucci *et al.* 2004). Los miembros de la familia Xylariaceae son bien conocidos por su función como descomponedores de madera y restos vegetales; por ejemplo *X. digitata* causa el 16% de la pérdida de peso en madera de álamo (Rajagopalan 1996). Petrini *et al.* (1995) y Whalley (1996) postulan que las especies de *Xylaria* endófitas permanecen latentes hasta la senescencia de los

tejidos del hospedero, momento en el cual comienzan la descomposición de los tejidos. Esto les otorga ventaja frente a otros saprotrofos competidores, en la colonización temprana y el máximo aprovechamiento del recurso. Aunque las Xylariaceae sean conocidas por su actividad descomponedora, Promputtha *et al.* (2007) no aislaron *Xylaria* sp. como saprófito en hojas de *M. lilifera* pero sí obtuvieron aislamientos como endófitos en estas hojas, y las especies de *Xylaria* aisladas como endófitos presentaron habilidad de producir enzimas degradadoras, indicando que están adaptadas para una vida saprofítica.

El total de los aislamientos pertenecientes a Xylariales obtenidos en las tres plantas, representan un porcentaje importante de la comunidad fúngica (12 %) y presentaron en general una importante actividad de los tres complejos enzimáticos estudiados, pectinasas, celulasas y ligninasas, lo que se corresponde con su actividad descomponedora confirmando su adaptación a la vida saprofítica. A diferencia de los otros aislamientos *Xylaria* sp. 120 provocó amarillamiento en el disco de hoja a partir del cual fue aislado, por ello fue incluido en el estudio de fitotoxicidad y se observó que era capaz de producir metabolitos fitotóxicos, provocando una lesión importante en las hojas en la zona donde se colocó el extracto con los metabolitos obtenidos a partir del cultivo de este hongo, pudiendo tratarse de un patógeno latente.

N. sphaerica es un endófito (Lorenzi *et al.* 2006; Durán *et al.* 2005) que también ha sido considerado patógeno (Verma & Gupta 2008) en numerosas plantas provocando manchas foliares. En nuestro país fue aislado como endófito de hojas de *Eucalyptus* spp. y de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Bettucci *et al.* 2004). El género *Nigrospora* se caracteriza por ser capaz de producir metabolitos secundarios tales como nigrosporinas fitotóxicas y antibacterianas (Tanaka *et al.* 1997), lactonas herbicidas tales como la phomalactona (Kim *et al.* 2001) y compuestos con actividad antifúngica (griseofulvinas) (Zhao *et al.* 2012).

Todos los aislamientos de *N. sphaerica* obtenidos de las 3 plantas produjeron enzimas celulolíticas, ninguno de ellos produjo ligninasas y solamente un aislamiento (113) obtenido de *M. cisplatensis* fue capaz de producir pectinasas.

Este aislamiento además produjo metabolitos fitotóxicos que provocaron necrosis en los tejidos de las hojas donde fue aplicado el extracto crudo conteniendo los metabolitos. Ambas capacidades permitirían suponer que este aislamiento corresponde a un posible patógeno latente capaz de producir manchas en hojas de plantas.

Si bien algunos estudios previos han sugerido que la composición de especies y la frecuencia de endófitos varía con los diferentes tejidos de la planta hospedera (Suryanarayanan & VijayKrishna 2001; Kumar & Hyde 2004; Sun *et al.* 2012), nuestros resultados en plantas nativas mostraron que los tejidos no tuvieron un efecto significativo sobre la composición de la comunidad de endófitos.

Sun *et al.* (2008) indicó que las comunidades de hongos endófitos eran diferentes en ramas y hojas en seis especies de plantas medicinales, en este estudio sólo se observó diferencia en la composición de la comunidad endofítica de hojas y ramas en *M. atropurpureun*, donde las hojas estuvieron caracterizadas por *G. mangiferae*, y las ramas por *M. pestalozzoides* y *Preussia* sp.

En *M. cisplatensis* y en *E. uruguayensis* no se observaron diferencias en la composición de los ensamblajes fúngicos en hojas y ramas.

De todos modos, para entender completamente el efecto del hospedero, de los órganos y de tejidos sobre la estructura de la comunidad endofítica, y poder determinar si existe preferencia en cada caso, deben realizarse estudios en más especies de plantas nativas.

G. mangiferae (anamorph: *Phyllosticta capitalensis* Henn) ha sido encontrada como endófito y se la ha aislado de numerosas plantas (Baayen *et al.* 2002). Este hongo fue confundido durante mucho tiempo con el patógeno de cítricos causante de la mancha negra *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorph: *Phyllosticta citricarpa* McAlpine), pero con técnicas moleculares se logró separar ambas especies (Bonants *et al.* 2003; Van Gent-Pelzer *et al.* 2007). Estas especies difieren además en la capacidad de producir enzimas hidrolíticas, especialmente las pectinasas, lo cual podría estar asociado con las diferentes estrategias usadas por

ambas especies para infectar, colonizar e inducir o no síntomas de enfermedad en plantas de citrus. El patógeno *G. citricarpa* penetra directamente en los tejidos y permanece latente por 4-6 meses, luego de este período se producen las lesiones en los frutos (órganos ricos en pectinas) mostrando que las enzimas pectinolíticas no están involucradas en la invasión primaria pero si con el desarrollo de los síntomas de enfermedad, mientras que en el caso de *G. mangiferae*, las pectinasas pueden ser importantes para la colonización endofítica y de tejidos senescentes o muertos (Romão *et al.* 2011).

Los aislamientos de *G. mangiferae* obtenidos en este trabajo no evidenciaron una actividad pectinolítica importante en cultivo a las 72 horas de incubación, presentando importante actividad ligninolítica. En cuanto a la fitotoxicidad, los extractos obtenidos en cultivo produjeron una lesión muy pequeña únicamente en el borde de las perforaciones realizadas. Esto concuerda con la característica estrategia de vida endofítica que presenta esta especie.

M. pestalozzoides es un coelomycete perteneciente a las Amphisphaeriaceae que ha sido aislado de ramas muertas de *Artemisia camphorata* Vill. (Berlese & Bresadola 1889) y en forma endofítica se encontró en ramas de *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau. (Collado & Arenal 1998). Collado *et al.* 2006 encontraron un compuesto con actividad antifúngica en extractos de *M. pestalozzoides* (F-090354) en cultivo, que denominaron moriniafungina y es un análogo a la sordarina. La moriniafungina es un inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariotas que tiene mayor espectro antimicótico y un valor de concentración inhibitoria mínima menor que la sordarina (Basilio *et al.* 2005). No observaron producción de moriniafungina por el hongo endofítico *Morinia longiappendiculata* Collado & Platas en cultivo, ni por cepas taxonómicamente relacionadas como *Bartalinia*, *Truncatella* y *Pestalotiopsis* spp. En este estudio, los extractos obtenidos a partir de aislamientos de *M. pestalozzoides* en cultivo, no presentaron actividad inhibitoria frente a bacterias ni a hongos.

El género *Preussia* Fuckel; pertenece a la familia *Sporormiaceae* (ascomycetes bitunicados) y comprende especies de suelo, madera y restos vegetales (Cain 1961; Ahmed & Cain 1972; Arx & van der Aa 1987; Arenal *et al.* 2004; 2005). Arenal *et al.* 2007 aislaron una nueva especie de *Preussia* como endófito de diferentes especies de plantas mediterráneas, esta nueva especie, *Preussia mediterranea* Arenal, Platas & Peláez es similar a *P. australis*, *P. africana* y *Preussia similis* (R.S. Khan & Cain) Arenal y fue descrita exclusivamente de un grupo de aislamientos endofíticos aislados de plantas colectadas en diferentes localidades geográficas en España.

Peterson *et al.* (2009) aislaron especies de *Preussia* a partir de heces de Koala cuya única dieta consiste enteramente en hojas de *Eucalyptus* sp., las que contienen lignina, celulosa, taninos y aceites esenciales, las heces por lo tanto constituyen un sustrato recalcitrante compuesto por fibras muy lignificadas, celulosa y fenoles. Algunos hongos coprófilos son capaces de producir enzimas para degradar estos sustratos complejos (Anh *et al.* 2007) y algunas otras especies tales como *Podospora anserina* (Rabenh.) Niessl y *Sporormiella vexans* (Auersw.) S.I. Ahmed & Cain también son capaces de producir metabolitos con propiedades antibacterianas y antifúngicas (Wang *et al.* 1997; Soman *et al.* 1999). Nuestros aislamientos de *Preussia* sp. produjeron en general celulasas, ligninasas y uno de ellos producía también pectinasas. En cuanto a la producción de metabolitos con bioactividad, un aislamiento de *P. australis* y 2 de *P. africana* presentaron actividad inhibitoria frente a bacterias (*E. coli*, *S. aureus* y *X. axonopodis*). Estos resultados indican que los hongos pertenecientes a este género deberían tenerse en cuenta para la búsqueda de organismos productores de metabolitos bioactivos.

El porcentaje de colonización fúngica fue mayor en la corteza de las ramas que en las hojas, similares resultados fueron obtenidos en otros estudios de hongos endófitos (Wang & Guo 2007; Guo *et al.* 2008; Sun *et al.* 2008). Esto puede ser causado por las diferencias en la estructura de las ramas y los tejidos de las hojas o porque las ramas permanecen más tiempo en la planta que las hojas, pudiendo

acumular más propágulos fúngicos por infecciones repetidas (Fisher *et al.* 1986; Wang & Guo 2007; Guo *et al.* 2008; Sun *et al.* 2011).

A pesar de las diferencias en el porcentaje de colonización de los órganos, la diversidad estimada según el índice de Shannon (H') fue similar en hojas y ramas en cada una de las plantas estudiadas, dado que para dicho cálculo se toma en cuenta el número total de especies fúngicas que fueron aisladas y la equidad o uniformidad en sus abundancias. La diversidad de la comunidad fúngica en las plantas estudiadas estuvo dentro del rango de diversidad encontrado en otras Mirthaceae nativas (*A. sellowiana*, *B. salicifolius* y *M. glaucescens*). La comunidad fúngica más diversa fue la asociada a *M. atropurpureum* ($H'= 2,949$) ya que valores de 3 ó 4 son interpretados como “diversos” (Gliessman 2002)

El análisis semicuantitativo de enzimas endocelulasas, pectinasas y ligninasas, permite determinar la capacidad de los hongos endófitos aislados de descomponer los polímeros que forman la pared celular de las plantas, y en base a este estudio tratar de comprender la función de estos hongos y determinar la capacidad de cambiar su estrategia de vida endofítica a saprofítica o patogénica.

Dado que la producción de enzimas por un hongo en la naturaleza determina su capacidad patogénica o degradadora (Archer & Word 1995), Sieber *et al.* (1991) sostienen que la producción de celulasas y pectinasas juntas en el endófito *Leptostroma* podría implicar que el hongo esté bien equipado para la penetración en las células vegetales y la descomposición de tejidos muertos. Brett (1990a) señaló que las principales enzimas que participan en los ataques de tejidos vivos de las plantas por microorganismos eran enzimas pectinasas, inducidas tanto en hongos patógenos como en bacterias. Las sustancias pécticas se encuentran predominantemente en la pared primaria de las células vegetales y en la laminilla media. Si un endófito solamente produce pectinasas implica que podría ser un patógeno latente, mientras que los hongos que producen celulasas, hemicelulasas y ligninasas, estarían capacitados para degradar los componentes de la pared celular y por lo tanto tendrían la habilidad de competir con otros hongos en hojas y ramas muertas (Carroll & Petrini 1983). Prácticamente todos los hongos endófitos

aislados (98%) presentaron actividad para alguno de los tres complejos enzimáticos estudiados, el 84% de los aislamientos produjeron endocelulasas, 60% produjeron pectinasas y 51% de los endófitos aislados produjeron ligninasas. La mayoría de los aislamientos endofíticos presentaron capacidad degradadora de acuerdo con la actividad enzimática observada, en general produjeron 2 de las enzimas estudiadas o las 3. Esto confirma que los hongos endófitos son capaces de pasar a un estilo de vida saprofítica y degradar los componentes de la pared celular de los vegetales. Solamente 4 aislamientos pertenecientes al complejo *Diaporthe/Phomopsis* produjeron únicamente enzimas pectinasas, dejando abierta la posibilidad que esos aislamientos pudieran corresponder a patógenos latentes. En cuanto a la actividad celulolítica y ligninolítica se destacan los aislamientos correspondientes a las Xylariales y los Basidiomycetes *Lentinus tigrinus* y *Phlebiopsis gigantea* que presentaron una fuerte actividad ligninolítica. Estos Basidiomycetes descomponedores de madera, aislados con muy baja frecuencia (1 aislamiento de cada especie), no han sido aislados como endófitos en otras Myrtaceae nativas, pero sí se aislaron como colonizadores latentes en xilema y corteza de las ramas y troncos de *Eucalyptus* spp. en Uruguay (Simeto *et al.* 2005). Además se han observado comúnmente las fructificaciones de *L. tigrinus* alrededor de los tocones de los árboles cortados (Alonso *et al.* 2012). Estos hongos son activos productores de enzimas oxidativas extracelulares y han sido usados para degradar lignina de madera de *E. globulus* y *E. grandis* (Bettucci *et al.* 1998) y para el blanqueo de pasta de celulosa de *Eucalyptus* spp. (Speranza 2003).

En cuanto a la evaluación del efecto fitotóxico de los extractos obtenidos a partir de los hongos en cultivo, sobre los tejidos vivos de hojas de *E. uruguayensis*. La presencia de síntomas como necrosis, decoloración o manchas, indicaría que esos hongos endófitos son capaces de producir metabolitos fitotóxicos y por lo tanto podrían ser patógenos latentes. A pesar que los aislamientos seleccionados para este estudio pertenecían a géneros de hongos que incluyen especies fitopatógenas, muy pocos aislamientos fueron capaces de provocar necrosis en

las hojas. *N. sphaerica* 113 y *Xylaria* sp. 120 fueron los aislamientos que provocaron los síntomas más evidentes. Además, *Xylaria* sp. 120 producía clorosis cuando el micelio emergía de los discos de hojas inoculadas y crecía en el medio de cultivo. Otros 7 aislamientos presentaron fitotoxicidad muy leve.

En general, la mayoría de los hongos endófitos no presentaron capacidad de producir metabolitos fitotóxicos, y muy pocos podrían ser considerados patógenos latentes. Este aspecto es importante considerando que las plantas nativas podrían ser un reservorio de patógenos que pudieran afectar plantaciones forestales de Myrtaceae fundamentalmente.

Algunos géneros de hongos aislados comúnmente como endófitos, incluyen especies productoras de una gran cantidad de nuevos compuestos. De acuerdo con esto, para la evaluación de la producción de metabolitos con actividad inhibitoria, se seleccionaron aquellos aislamientos pertenecientes a géneros y especies previamente conocidos por ser productores de metabolitos bioactivos. La mayoría de los aislamientos endofíticos seleccionados con este criterio (16 de 19) presentaron algún tipo de actividad inhibitoria frente a uno o varios de los microorganismos patógenos estudiados. Se destacó el aislamiento *Lophiostoma* 246 (posiblemente *Lophiostoma hysteroioides* Curr. ex Cooke) por presentar actividad inhibitoria frente a todos los microorganismos estudiados. El género *Lophiostoma*, ha sido citado como productor potencial de compuestos con bioactividad (Miao & Qian 2005). Este hongo aislado de la corteza de rama de *E. uruguayensis* emergió tardíamente del fragmento de tejidos inoculado en comparación con los demás endófitos aislados. Además presentó un escaso desarrollo en el medio de cultivo y permaneció estéril, formando numerosas clamidosporas. Estas características indican una clara adaptación de este hongo a la vida endofítica. Por otro lado este aislamiento presentó actividad enzimática para celulasas, pectinasas y ligninasas indicando que es capaz de degradar los compuestos vegetales siendo probablemente un hongo muy competitivo.

También *C. gloeosporioides* 205, *S. opuntiae* 145 y *A. alternata* 101 presentaron buena actividad inhibitoria frente al patógeno humano *S. aureus*. Por otro lado, los

aislamientos de *P. africana* 33 y 33' presentaron actividad frente a la bacteria fitopatógena *X. campestris*.

Rodríguez *et al.* (2000) consideraron a *Pestalotiopsis guepinii* como “especie creativa”, pero en nuestro caso esta especie se aisló con muy baja frecuencia. El aislamiento 104 presentó actividad inhibitoria muy leve frente a *S. aureus*, mientras el aislamiento 104' no presentó actividad inhibitoria. De cualquier modo esta especie es importante por ser capaz de producir metabolitos con otros tipos de bioactividad, por ejemplo algunos aislamientos producen Taxol, un importante metabolito anticancerígeno (Strobel *et al.* 1997).

En la búsqueda de nuevos metabolitos que pudieran ser aplicados para el control de microorganismos patógenos, resulta importante determinar si dichos metabolitos pudieran presentar actividad toxicogénica. Con esta finalidad se aplicó a los extractos fúngicos obtenidos a partir de los hongos endófitos en cultivo, el ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*. Un extracto resultó no tóxico (NT) y todos los restantes fueron levemente tóxicos (LT).

La detección de endófitos capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos y de plantas y a su vez con toxicidad leve o no tóxicos, confirma que los hongos endófitos de plantas nativas son una buena fuente para la búsqueda de nuevos metabolitos con bioactividad.

El aislamiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* como endófito en xilema de *E. uruguayensis*, es importante dado que este organismo es utilizado para el control biológico de insectos plaga. Por ejemplo, suspensiones de conidios de *M. anisopliae* var. *acridum* aplicados con pulverizador han sido utilizadas para el control de la langosta en África (Langewald & Kooyman 2007).

Metarhizium spp. son endófitos comúnmente encontrados en varios ecosistemas. Se lo encuentra en el suelo, asociado a las raíces de las plantas y es patógeno de numerosos insectos. Es posible que la capacidad endofítica y la patogenicidad de *Metarhizium* estén asociadas para transferir nitrógeno a la planta vía el micelio del hongo. Behie *et al.* 2012, encontraron que *Metarhizium* podía parasitar y matar insectos del suelo y transferir el nitrógeno derivado a las plantas vía el micelio y la

asociación endofítica. El hongo en contrapartida recibiría de la planta fuentes carbonadas.

El hongo se adhiere a las raíces mediante adhesinas (Wang & St. Leger 2007).

Luego de la adhesión germina y forma estructuras especializadas de infección, apresorios, que se diferencian a partir del ápice de los tubos germinativos durante la penetración.

Las funciones de adhesión están reguladas por dos genes distintos (*mad 1* –MAD 1 adhesión a insectos - y *mad 2* MAD 2 adhesión a la epidermis de plantas).

Los apresorios maduros producen estructuras delgadas denominadas “peg” que rompen la cutícula del insecto por combinación de presión mecánica y enzimas quitinolíticas y lipolíticas. Los apresorios secretan enzimas proteolíticas extracelulares que solubilizan la cutícula del insecto a partir de la cual el hongo se nutre (Zhang Xia & Li 2011) e invade la hemolinfa produciendo metabolitos secundarios que a su vez son probablemente factores de virulencia (Fang *et al.* 2009). En la hemolinfa el hongo produce blastosporas inhibiéndose las enzimas que le permitieron atravesar la cutícula. Cuando los nutrientes se van agotando el hongo que ha acumulado sustancias de reserva vuelve a adoptar la forma filamentosa y a segregar las lipasas y quitinasas para atravesar la cutícula en el insecto muerto. Una vez alcanzada la parte externa esporula y está en condiciones de volver a infectar otros insectos o penetrar las raíces de las plantas. El aislamiento *M. anisopliae* 238 infectó exitosamente hormigas, provocando la muerte de todas ellas en 7 días y esporulando en el exterior del insecto de donde fue reaislado. La caracterización enzimática de esta cepa de *M. anisopliae* mostró que es capaz de producir proteasas y quitinasas, ambas consideradas factores de virulencia, indicando una importante capacidad entomopatogénica.

7. CONCLUSIONES

-Prácticamente todos los taxa aislados pertenecen al grupo de Ascomycetes, encontrándose solamente 2 aislamientos pertenecientes a Basidiomycetes.

Las especies aisladas con mayor frecuencia son endófitos típicos que ya han sido aislados de numerosas plantas, incluso de otras Myrtaceae nativas.

Los Basidiomycetes aislados son hongos descomponedores de madera que se encuentran comúnmente en plantaciones forestales en nuestro país.

-Existen diferencias en los ensambles fúngicos de las 3 especies de plantas estudiadas, esto podría indicar que existe preferencia por el hospedero. Por el contrario los órganos y tejidos no tuvieron un efecto significativo sobre la composición de la comunidad de endófitos indicando que no existe preferencia por órganos, excepto en *M. atropurpureun* donde se observó diferencia en la composición de la comunidad endofítica de hojas y ramas.

-La mayoría de los aislamientos endofíticos presentaron (de acuerdo con la actividad enzimática observada) capacidad de degradar los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales, confirmando que los hongos endófitos son capaces de pasar a un estilo de vida saprofítica. Destacándose en este aspecto Xylariales y Basidiomycetes.

-Muy pocos aislamientos podrían ser considerados patógenos latentes en base a la capacidad de producir metabolitos fitotóxicos y pectinasas. Esos aislamientos pertenecen a *N. sphaerica* 113, *Xylaria* sp. 120 y también algunos aislamientos correspondientes al género *Phomopsis*, que se obtuvieron principalmente de *E. uruguayensis*. Este aspecto es importante considerando que algunas Myrtaceae nativas podrían ser un reservorio de patógenos que pudieran afectar a las plantaciones forestales.

- Se encontraron especies fúngicas capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos y de plantas y a su vez con toxicidad leve o no tóxicos. Se destacó el aislamiento de *Lophiostoma* sp. 246, que probablemente corresponda a la especie *L. histerioides*. Esto confirma que los hongos endófitos de las Myrtaceae nativas pueden ser una fuente de metabolitos secundarios con algún tipo de bioactividad, ofreciendo una oportunidad para la búsqueda de nuevos medicamentos y agroquímicos.

-La presencia de especies con capacidad antagónica frente a microorganismos, y de entomopatógenos, dentro de la comunidad de hongos endófitos, indica que los endófitos de plantas nativas además de ser una buena fuente para la búsqueda de metabolitos bioactivos, también lo son para la selección de cepas antagonistas aplicables en el control biológico de enfermedades y plagas.

8. PERSPECTIVAS

-Continuar con el estudio de los hongos endófitos en otras especies de plantas nativas, para entender el efecto del hospedero, de los órganos y de tejidos sobre la estructura de la comunidad endofítica, y poder determinar si realmente existe preferencia de los hongos para la colonización de los mismos.

-Realizar un estudio más amplio de la capacidad enzimática que presentan los hongos endófitos, incorporando más aislamientos de otras plantas nativas y sumando al estudio otras enzimas como por ejemplo amilasas, xilanasas, mananasas y proteasas entre otras, que permitan concluir con mayor profundidad sobre la función ecológica de los endófitos en la degradación de los biopolímeros vegetales así como su posible patogenicidad.

-Profundizar el estudio de los metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por los hongos endófitos, separar las fracciones activas, e identificar cuales son los compuestos con bioactividad presentes en los extractos fúngicos.

-Continuar con la evaluación de la capacidad entomopatogénica de la cepa de *M. anisopliae* aislado como endófito frente a otros insectos considerados plaga, y realizar evaluaciones de aplicación a campo en hormigueros con el fin de determinar la capacidad de este aislamiento para el control biológico de las hormigas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed S.I., and Cain R.F. 1972. Revision of the genera *Sporormia* and *Sporormiella*. *Canadian Journal of Botany* 50: 419-477.
- Alonso R., Lupo S., Martínez S., Tiscornia S. and Bettucci L. 2012. Development of sprouted stumps of *Eucalyptus globulus* and *E. maidenii* in Uruguay. *Journal of Australian Forestry* 75: 130-134.
- Anh D.H., Ullrich R., Benndorf D., Svatos A., Muck A. and Hofrichter M. 2007. The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Applied and Environ Microbiol* 73, 5477-5485.
- Archer D.B. and Wood D.A. 1995. Fungal exoenzymes. In: *The Growing Fungus* (eds. N.A.R. Gow and G.M. Gadd) Chapman & Hall, UK: 137-162.
- Arechavaleta M., Bacon C.W., Hoveland C.S. and Radcliffe D.E. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal* 81: 83-90.
- Arenal F., Platas G. and Peláez F. 2004. Variability of spore length in some species of the genus *Preussia* (*Sporormiella*). *Mycotaxon* 89: 137-151.
- Arenal F., Platas G. and Peláez F. 2005. Two new *Preussia* species defined based on morphological and molecular evidence. *Fungal Diversity* 20: 1-15.
- Arenal F., Platas G. and Peláez F. 2007. A new endophytic species of *Preussia* (Sporormiaceae) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. *Fungal Diversity* 25: 1-17.
- Arivudainambi U.S., Anand T.D., Shanmugaiah V., Karunakaran C. and Rajendran A. 2011. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 61(3): 340-5.
- Arnold A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress challenges, and frontiers. *Fungal Biological Reviews* 21: 51-66.
- Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S., Coley P.D. and Kursar T.A.. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 3: 267-274.
- Arnold A.E., Maynard Z. and Gilbert G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105: 1502-1507.

- Arnold A. E. and Herre E.A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonisation by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95:388-389.
- Arnold A.E., Mejía L.C., Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 15649-15654.
- Arnold A. E. and Lewis L.C. 2005. about Evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. Oxford University Press, Oxford. pp. 74-96.
- Arnold A.E. and Lutzoni F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88:541-549.
- Aro N., Pakula T. and Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 29:719-739.
- Arx J.A. von and Van der Aa H.A. 1987. *Spororminula tenerifae* gen. et sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society* 89: 117-120.
- Assante G., Nasini G., Zhang S. and Bradshaw R.E. 2009. A novel secondary metabolite from the *Eucalyptus* pathogen *Mycosphaerella cryptica*. *Forest Pathology*. 39: 289-292.
- Baayen R.P., Bonants P.J., Verkley G. and Carroll G.C. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92: 464-477.
- Bacon C.W. and Hill N.S. 1996. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grasses. In. *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. S. C. Redlin & L. M. Carris, eds. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN. 155-178.
- Bailey J.A. and Jeger M.J. 1992. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford, UK: CAB International. 388 p.
- Baker D., Mocek U. and Garr C. 2000. Natural Products vs. Combinatorials: a case study, p 66-72. In S. K. Wringley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Cristal, & N. Nicholson (ed.), *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Barengo N., Sieber T.N. and Holdenrieder O. 2000. Diversity of endophytic mycobiota in leaves and twigs of pubescent birch (*Betula pubescens*). *Sydowia* 52: 305-320.

- Basilio A., Justice M., Harris G., Bills G.F., Collado J., de la Cruz M., Díez M.T., Hernández P., Liberator P., Nielsen Kahn J., Pelaáez F., Platas G., Schmatz D., Shastry M., Tormo R. and Vicente F. 2005. The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14:560-566.
- Baüer A., Kirby W., Sherris I. and Turk M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4): 493-496.
- Bayman P., Angulo-Sandoval P., Báez-Ortiz Z. and Lodge D.J. 1998. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycological Research* 102: 944-948.
- Behie S.W., Zelisko P.M. and Bidochka M.J. 2012. Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. *Science* 336: 1576.
- Berbee M.L. and Taylor J.W. 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (eds), *Systematics and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 229-245.
- Berestetskiy A. 2008. A Review of Fungal Phytotoxins: from Basic Studies to Practical Use. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44(5): 453-465.
- Berlese A. and Bresadola G. 1889. Micromycetes Tridentini. *Ann. Soc. Alpinisti Tridentini* 14:82-83.
- Bettucci L. and Alonso R. 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Mycological Research* 101:1060-1064
- Bettucci L., Alonso R. and Fernández L. M. 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs and seedlings of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Sydowia*, 49:109-117
- Bettucci L., Speranza M., Piaggio M., Siñeris F. and Breccia J. B. 1998. Degradation of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* by several white rot fungi isolated in South America. *Material und Organismen* 32: 227-233.
- Bettucci L., Alonso R. and Tiscornia S. 1999. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *E. globulus* and *E. grandis* in the central west region of Uruguay. *Mycological Research* 103: 468-472.
- Bettucci L., Simeto S., Alonso R. and Lupo S. 2004. Endophytic fungi of twigs and leaves from three wild species of Myrtaceae. *Sydowia*, 56: 8-23.

- Bettucci L., Lupo S., Giamberini P., Perez G. and Sanchez A. 2006. Control biológico de hormigas cortadoras mediante hongos entomopatógenos y *Trichodema*. Informe final. EUFORES.
- Bills GF. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: Redlin SC, Carris, LM (eds), *Endophytic Fungi in Grasses and woody Plants, Systematics, Ecology and Evolution*. American Phytopathological Society Press, St.Paul, Minnesota, pp. 31-65.
- Bills G.F. and Polishook J.D. 1991. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany* Vol. 69, 7 : 1477-1482.
- Bischoff J.F. and White J.F. 2005. Evolutionary development of the Clavicipitaceae. In: Dighton J, White JF, Oudemans P, eds. *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, 505-518.
- Bissegger M. and Sieber T.N. 1994. Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia* 86:648-655
- Boddy L. and Griffith G.S. 1989. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia* 41: 41-73.
- Bonants P.J.M., Carroll G.C., de Weerd M. and Van Brouwershaven I.R. (2003). Development and validation of a fast PCR based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 503-513.
- Brady S.F. and Clardy J. 2000. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from and endophytic fungi. *Journal of Natural Products* 63:1447-1448.
- Brett C.T. 1990a. Cell wall structure and the skeletal functions of the wall. In: *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls* (eds. C.T. Brett and K. Waldron). Unwin, Hyman, London: 4-57.
- Brett C.T. 1990b. Cell wall degradation. In: *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls* (eds. C.T. Brett and K. Waldron). Unwin, Hyman, London: 169-179.
- Brewer S. 2000. The relationship between natural products and synthetic chemistry in the discovery process, p. 59-65. In : S. K. Wringley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Cristal, & N. Nicholson (ed.), *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Brundrett M.C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations, *Biological Reviews* **79**: 473-495.

- Brussa C. A. and Grela I. A. 2007. Flora arbórea del Uruguay. COFUSA. Uruguay.
- Bultman T.L. and Murphy J.C. 2000. Do fungal endophytes mediate wound-induced resistance?. In: C.W. Bacon and J.F. White, Editors, *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York. 421-455.
- Buss T. and Hayes M. A. 2000. Mushrooms, microbes and medicines, p. 75-85. In S. K. Wringley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Cristal, & N. Nicholson (ed.), Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Cabral D., Stone J.K. and Carroll G.C. 1993. The internal mycoflora of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns, *Mycological Research* **97**: 367-376.
- Cain R.F. 1961. Studies of coprophilous ascomycetes. VII. *Preussia*. *Canadian Journal of Botany* 39: 1633-1666.
- Cannon P.F. and Simmons C.M.. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94:210-220.
- Cannon P.F., Buddie A.G. and Bridge P.D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104:189-204.
- Carroll G.C. 1986. The Biology of Endophytism in Plants with Particular Reference to Woody Perennials. Fokkema NJ, van den Heuvel J (eds.). Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge, Inglaterra: University Press; p. 205-222
- Carroll G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*. 69 (1): 2-9.
- Carroll G. C. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: mycological research opportunities in Japan. *Transaction of Mycological Society of Japan*. 31: 103-116.
- Carroll G.C. 1995. Forest endophytes: Pattern and process. *Canadian Journal of Botany* 73(supplement 1): 1316-1324 .
- Carroll GC. 1999. The foraging Ascomycete. XVI International Botanical Congress, St Louis, MN
- Carroll G.C. and Petrini O. 1983. Patterns of substrate utilization by some endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75: 53-63

- Choi Y.W., Hodgkiss I.J. and Hyde K.D. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology* 1: 55-66.
- Chul-Kang S., Park S. and Gyu-Lee D. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 203-215.
- Clay K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 275-297.
- Collado J., Platas G. and Peláez F. 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. *Nova Hedwigia* 63: 347-360.
- Collado J., Platas G., Bills G.F., Basilio A., Vicente F., Tormo J.R., Hernandez P., Díez M.T. and Peláez F. 2006. Studies *Morinia*: Recognition of *Morinia longiappendiculata* sp. nov. as a new endophytic fungus and a new circumscription of *Morinia pestalozzioides*. *Mycologia*, 98: 616-627.
- Costa Pinto L.S.R., Azevedo J.L., Pereira J.O., Carneiro Vieira M.L. and Labate, C.A. 2000. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytologist* 147:609-615.
- Crous P.W. and Groenewald J.Z. 2005 Hosts, species and genotypes: opinions versus data. *Australas Plant Pathol* 34:463-470
- Davis E.C., Franklin J.B., Shaw A.J. and Vilgalys R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany* 90: 1661-1667
- De Bary A. 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Engelmann, Leipzig, Alemania.
- Deckert R.J., Melville L. and Peterson R.L. 2001. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle in the foliage of *Pinus strobus*, *Mycological Research* 105: 991-997.
- Demain A. L. 1981. Industrial microbiology. *Science* 214:987-994.
- Dickman M. 2007. Subversion or coercion? Pathogenic determinants in fungal phytopathogens. *Fungal Biology Reviews*. 21: 125-129.
- Dong Y., Wang L., Xu J., Zhang H., Zhang X. and Zhang L. 2001. Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.
- Dreyfuss M.M. and Petrini O. 1984. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. *Botanica Helvetica* 94: 33-40.

- Dreyfuss M. M. and Chapela I. H. 1994. Potencial of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals, p. 49-80. *In* V. P. Gullo (ed.), the discovery of natural products with therapeutic potencial. Butter-worth-Heinemann, London, UK.
- Duran E.L., Ploper L.D., Ramallo J.C., Grandi R.A.P., Giancoli C. and Azevedo J.L. 2005. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. *Can J Bot* 83: 350-355.
- Eggin H.O.W. and Pugh G.J.F. 1962. Isolation of cellulose decomposing fungi from soil. *Nature*, London 193:94-95.
- Fang W.G., Pava-ripoll M. and Wang S.B. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet Biol* 46(3):277-285
- FAO 2004. Pest risk analysis for quarantine pests, including analysis of environmental risks and living modified organisms ISPM No. 11. FAO, Rome.
- Farr D.F. and Rossman AY. 2009. Fungal Databases, Systematic mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved 15 Sep 2009, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Fisher P.J., Anson A.E. and Petrini O. 1986. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. *Transactions of British Mycological Society* 86: 153-156.
- Fisher P.J. and Petrini O. 1990. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. *Mycol. Res.* 94: 313-319.
- Gamboa M.A. and Bayman P. 2001. Communities of endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*). *Biotropica*. 33:352-360
- Gamboa-Gaitán, M.A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 S, 3-20.
- Gliessman S.R. 2002. Diversidad y estabilidad del agrosistema En: Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible. Editorial AGRUCO-CATIE. Turrialba, Costa Rica . P. 359 (cap.16 p. 242)
- Gloer J.B. 1997. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: D.T. Wicklow and B.E. Soderstrom, Editors, *The Mycota. Vol. IV. Environmental and Microbial Relationships*, Springer Verlag, New York. 249-268.

- González A.M., Presa M., Latorre M.G., Lurá M.C. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Rev. Iberoam. Micol.* 24: 59-61
- Guo B., Dai J., Ng S., Huang Y., Leong C., Ong W. and Carte, B. K. 2000. Cytonic acids A and B: novel tridepsides inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *J. Nat. Prod.*, 63:602-604.
- Guo L.D., Huang G.R. and Wang Y. 2008. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 997-1003.
- Hajek A.E. and St. Leger R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Hanada E., de Jorge Souza T., Pomella A., Hebbar K., Pereira J., Ismaiel A. and Samuels G. 2008. *Trichoderma martiale* sp.nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research* 112:1335-1343.
- Harper J., Mulgrew A.E., Li J.Y. Barich D.H., Strobel G.A. and Grant, D.M. 2001. Characterization of stereochemistry and molecular confirmation using solid state NMR tensors.
- Harper J. K., Ford E.J., Strobel G. A., Arif A. Grant D.M., Porco J., Tomer D.P. and Oneill K. 2003. Pestacin: A 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis* microspore possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, 59:2471-2476.
- Harwig J. and Scott P.M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. 1971. *Appl. Microbiol.* 21: 1011-1016.
- Hawksworth D. C. and Rossman, A. Y. 1987. Where are the undescribed fungi? *Phytopathology*, 87:888-891.
- Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation, *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited, *Mycological Research* 105: 1422-1431.
- Healy P.C., Ailsa Hocking A., Tran-Dinh N., Pitt, J. Shivas R.G., Mitchell J., Kotiw M. and Davis R. 2004. Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. *Phytochemistry*. 65: 2373-2378.
- Hoff J.A., Klopfenstein, N.B., McDonald, G.I., Tonn, J.R., Kim, M.S., Zambino, P.J., Hessburg, P.F., Rogers, J.D., Peever, T.L. and Carris, L.M. 2004. Fungal

endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology* 34(4): 255-271.

-Hoffman M.T. and Arnold A.E. 2007. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceus trees. *Mycological Research* 112:331-344.

-Horn W.S., Simmonds, M.S.J., Schwartz, R.E. and Blaney W.M. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 14:3969-3978.

-Hyde K. D. and Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33 : 163-173.

-Isaac S. 1992. Fungal-Plant Interactions. Ed Chapman & Hall. London.

-Isaacs, J. 2002. Aboriginal food and herbal medicine. New Holland Press, Sydney, Australia.

-James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin D.J., Spatafora J.W. and Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.

-Jumpponen A. and Trappe J.M. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140: 295-310.

-Kernaghan G. and Patriquin G. 2011. Host associations between fungal root endophytes and boreal trees. *Microbial Ecology* 62: 460-473.

- Kim J.C., Choi G.J., Park J.H., Kim H.T. and Cho K.Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag Sci* 57(6):554-559.

-Korkama-Rajala T., Müller M.M. and Pennanen T. 2008. Decomposition and Fungi of needle Litter from Slow- and Fast-growing Norway Spruce (*Picea abies*) Clones. *Microb Ecol* 56:76-89.

- Kowalski T. and Bartnik C. 1995. *Cryptosporiopsis radicola* sp. nov. from roots of *Quercus ruber*. *Mycological Research* 99: 663-666.
- Krebs J. C. 1989. *Ecological Methodology*. –Harper & Row, New York.
- Kumar D.S.S. and Hyde K.D. 2004. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17: 69-90.
- Langewald J. and Kooyman C. 2007. Green Muscle, a fungal biopesticide for control of grasshoppers and locusts in Africa. In: Vincent C., Goettel M.S., Lazarovits G. (Eds), *Biological control: a global Perspective*. CABI International/AAFC, Wallingford, United Kingdom, pp. 311-318.
- Lee S.B., and Taylor J.W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287 in M. A. INNIS, D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, and T. J. WHITE, eds. *PCR protocols*. Academic Press, San Diego.
- Legrand D. 1968. Las Mirtaceas del Uruguay, III. Apartado del Boletín de la Facultad de Agronomía Nº 101. Museo Nacional de Historia Natural. Montevideo. Uruguay.
- Léveillé J.H. 1846. *Considérations mycologiques suivis d'une nouvelle classification des champignons*. Paris.
- Li J.Y., Strobel G.A., Harper J.K., Lobkovsky E. and Clardy J. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiosis cf quercina*. *Org. Lett.* 2:767-770.
- Li J.Y., and Strobel G.A. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 57: 261-265.
- Lodge D.J., Fisher P.J. and Sutton B.C. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* 88:733-738.
- Lorenzi E., Lorando E. and Picco A.M. 2006. Microfunghi endofitici ed epifitici di *Picea abies* (L.) Karst. in ambiente naturale ed antropizzato in Lombardia *Forest@3*, 426.
- Lu G., Cannon P.D., Reid A. and Simmons C.M. 2004. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycol Res* 108:53-63.
- Lupo S., Tiscornia S. and Bettucci L. 2001. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus* *Revista Iberoamericana de Micología* 18: 33-36.

- Machado K.M.G., Matheus D.R. and Bononi V.L.R. 2005. Lignolytic enzyme production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 246-252.
- Malinowski D.P. and Belesky DP. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40: 923-940.
- Mejía L.C., Enith I., Rojas E.I., Maynard Z., Van Bael S., Arnold A.E., Hebbar P., Samuels G.J., Robbins N. and Herre E.A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol Control* 46:4-14.
- Miao L. and Qian P-Y. 2005. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong. *Aquat Microb Ecol.* Vol. 38: 231-238
- Mier T., Rosas-López B., Castellanos-Moguel J., García-Gutiérrez K. and Toriello C. 2004. Efecto de la citrolina sobre la viabilidad y la producción de proteasas y quitinasas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *acridium*. *Revista Mexicana de Micología* 19: 113-115.
- Morakotkarn D., Kawasaki H. and Seki T. 2007. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMS Microbiol Lett* 266:10-19.
- Mostert L., Crous P.W. and Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with shorts and leaves of *Vitis vinífera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52: 46-58.
- Müller M. M., Valjakka R., Suokko A. and Hantula J. 2001. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology* 10: 1801-1810.
- Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43 .
- Oliveira K.F., Malavolta L., Souza C.S., Vicente E.J. and Laluce C. 2006. Pectinolytic activity secreted by yeast isolated from fermented citrus molasses. *Journal of Applied Microbiology* 100: 633-640.
- Ortiz M.L. 2009. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia* 13(2):137-144.

- Oses R., Valenzuela S., Freer J., Baeza J. and Rodríguez J. 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and Wood biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 129-135.
- Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodríguez J. 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* 33: 77-86.
- Osono T. 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Can J Microbiol* 52:701-716.
- Osono T. 2008. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camillea japonica*: seasonal and leafdependent variations. *Mycologia* 100:387–391.
- Paterson R.R.M. and Bridge P.D.(eds) 1994. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. Cab International. Wallingford. UK.
- Peters S., Dammeyer B. and Schulz B. 1998. Endophyte–host interactions I. Plant defense reactions to an endophyte and a pathogenic fungus. *Symbiosis* 25: 193-211.
- Peterson R.A., Bradner J.R., Roberts T.H. and Nevalainen K.M.H. 2009. Fungi from koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces exhibit a broad range of enzyme activities against recalcitrant substrates. *Letters in Applied Microbiology* 48: 218-225.
- Petrini L. and Petrini O. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia* 38:216-234.
- Petrini O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. In: *Microbiology of the Phyllosphere*. N. J. Fokkema & J. van den Heuvel eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 175-187.
- Petrini O. 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves. Andrews JH, Hirano SS (eds.) *Microbial Ecology of Leaves*. Nueva York, USA:Springer Verlag; p. 179-197.
- Petrini O. 1996. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In: *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. S. C. Redlin & L. M. Carris, eds. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN. 87-100.
- Petrini O., Petrini L.E. and Rodrigues K. 1995. *Xylariaceus endophytes: An Exercise in Biodiversity*. *Fitopatol Bras.* 20: 531-539.

- Priti V., Ramesha B.T., Shweta S., Ravikanth G., Ganeshaiyah K.N., Suryanarayanan T.S. and Uma S.R. 2009. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Current Science* 97: 4-6.
- Promputtha I., Jeewon R., Lumyong S., McKenzie E.H.C. and Hyde K.D. 2005. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non-sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Diversity* 20: 167-186.
- Promputtha I., Lumyong S., Dhanasekaran V., Mckenzie E.H.C., Hyde K.D. and Jeewon R. 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microb Ecol* 53, 579-590.
- Pulici M., Sugawara F., Koshino H., Uzawa J., Yoshida S., Lobkovsky E. and Clardy J. 1996. Pestalotiopsina-A and pestalotiopsina-B: new caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus brevifolia*. *J. Org. Chem.*, 61:2122-2124.
- Qin J.C., Zhang Y.M., Gao J.M., Bai M.S., Yang S.X., Laatsch H. and Zhang A.L. 2009. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (on line).
- Rajagopalan C. 1996. Studies on four species of wood rotting fungi. *Trans Kans Acad Sci* 68: 541-552
- Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J. and Henson J.M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis, *Science* 298:1581
- Rodrigues K.F. 1996. Fungal Endophytes of Palms. Redlin S.C.,Carris L.M. (eds.). *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. Systematics, Ecology, and Evolution*. San Paul, USA:ASP Press. P. 121-132.
- Rodrigues K.F; Leuchtman A. and Petrini O. 1993. Endophytic species of *Xylaria*: cultural and isozymic studies. *Sydowia* 45: 116-138.
- Rodrigues K.F. and Petrini O. 1997. Biodiversity of Endophytic Fungi in Tropical Regions. HYDE KD(ed.). *Biodiversity of Tropical Microfungi*. Hong Kong University Press. P. 57-69.
- Rodrigues K.F., Hesse M. and Werner C. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology* 40: 261-267.
- Rodriguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y. and Redman R.S. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology* 2: 404-416.

- Rodríguez R. J., White J. F. Jr., Arnold A. E. and Redman R. S. 2009. Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist* 182.2: 314-330.
- Rojas E.I., Rehner S.A., Samuels G.J., Van Bael S.A., Herre E.A., Cannon P., Chen R., Pang J., Wang R., Zhang Y., Peng Y-Q. and Sha T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102:1318-1338.
- Romão A.S., Spósito M.B., Andreote F.D., Azevedo J.L. and Araújo W.L. 2011. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 243-252.
- Rossman A.Y., Farr D.F. and Castlebury L.A. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48:135-144
- Ruiz R. 2012. Hongos endófitos asociados a estructuras reproductivas del Guayabo Blanco (*Eugenia uruguayensis*); producción de enzimas y metabolitos bioactivos. Tesina de Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay.
- Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M. and Sullivan T.J. 1998. Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annu Rev Ecol Syst.* 29:319-343.
- Schardl C.L. 2001. *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses, *Fungal Genetics and Biology* 33: 69-82.
- Schneider H., Schuettepelz E., Pryer K.M., Cranfill R., Magallon S. and Lupia R. 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* 428: 553-557
- Schutz B. 2001. Endophytic fungi : a source of novel biological active secondary metabolites. British mycological society. International Symposium Proceedings: Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation. University of wales, Swansea, pp: 20.
- Schulz B., Wanke U., Draequer S. and Aust H.J. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological research* 97:1447-1450.
- Schulz B., Guske S., Dammann U. and Boyle C. 1998. Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction, *Symbiosis* 25: 213-227.
- Schulz B., Römmert A-K., Dammann U, Aust H-J. and Strack D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycol Res* 103:1275-1283.

- Schulz B., Boyle C., Draeger S. and Römmert A-K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.
- Schulz B. and Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological research* 109: 661-686.
- Sieber T. and Hugentobler C. 1987 Endophytic fungi in leaves and twigs of healthy and diseased beech trees (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Pathology* 17: 411-425
- Sieber, T.N., Sieber-Canavesi, F. and Dorworth, C.E. 1991. Endophytic fungi of fungi alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Canadian Journal of Botany* 69: 407-411.
- Sieber T.N., Rys J. and Holdenrieder O. 1999. Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *uncinata*. *Mycological Research* 103: 306-310.
- Sieber T.N. 2007 Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev* 21: 75-89.
- Sieber-Canavesi F. and Sieber T.N. 1993. Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.). *New Phytol.* 125:149-161.
- Siegel M.R. and Schardl C.L. 1991 Fungal endophytes of grasses: detrimental and beneficial associations. In JH Andrews, SS Hirano, eds, *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, pp 198-221
- Simeto S, Alonso S., Tiscornia S. and Bettucci L. 2005 Fungal community of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* stems in Uruguay *Sydowia*, 57: 246-258.
- Sock J. and Hoppe H. 1999. *J. Phytopathol.* 147(3): 169-173.
- Soman A.G., Gloer J.B., Koster B. and Malloch D. 1999 Sporovexins a-c and a new preussomerin analog: antibacterial and antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella vexans*. *J. Nat. Prod.* 62, 659-661.
- Speranza M. 2003. Hongos de la podredumbre blanca: deslignificación y control biológico del pitch en *Eucalyptus globulus*. Tesis de Doctorado. PEDECIBA-Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
- Steinberg, G. 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids and the Spitzenkörper. *Eucariotic Cell*, 6: 351-360.

- Stierle, A., Strobel, G. A. and Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science* 260: 214-216.
- Stone, J.K. 1987. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, *Canadian Journal of Botany* 65: 2614-2621.
- Stone J.K., Viret O., Petrini O. and Chapela I. 1994. Histological studies of host penetration and colonization by endophytic fungi.. In: O. Petrini and G.B. Ouellette, Editors, *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi*, American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.115-128.
- Stone J. K., Bacon C.W. and White J. F. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: *Microbial endophytes*. C. W. Bacon and J. F. White, editors. Marcel Dekker, New York, USA. 3-30.
- Strobel G., Hess W.M., Li J.Y., Ford E., Sidhu R.S. and Summerell B. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany* 45: 1073-1082.
- Strobel G.A., Dirksie E., Sears J. and Markworth C. 2001. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147: 2943-2950
- Strobel, G.A., Ford, E., Worapong J., Harper J.K. , Arif, A.M. Grant, D.M. Fung, P.C.W. and Chan K. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspore*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, 60: 179-183.
- Strobel G.A., Daisy B., Castillo U. and Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67 :257-268.
- Strobel G.A., Daisy B. and Castillo U. 2005. The biological promise of microbial endophytes and their natural products. *Plant Pathology Journal*, 4:161-176.
- Sun J.Q., Guo L.D., Zang W., Ping W. and Chi D.F. 2008. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Science in China Series C* 51: 751-759.
- Sun X., Guo L.D. and Hyde K.D. 2011. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity* 47: 85-95.
- Sun X., Ding Q., Hyde K.D. and Guo L.D. 2012. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology* 5: 624-632.
- Suryanarayanan T. S. and Vijaykrishna D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus*. *Fungal Diversity* 8: 155-161.

- Suryanarayanan T. S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M. B., Sasse F., Jansen R. and Murali T. S. 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23: 9-19.
- Suryanarayanan T.S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M. and Gopalan V. 2012. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*. DOI 10.1007/s13225-012-0168-7.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10): 2731-2739 first published online May 4, 2011.
- Tanaka M., Fukushima T., Tsujino Y. and Fujimori T. 1997. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61(11):1848-1852.
- Udayanga D., Liu X.X., McKenzie E.H.C., Chukeatirote E., Bahkali A.H. and Hyde K.D. 2011. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Divers*. 50:189-225
- Uecker F.A. 1988 A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycol Mem* 13:1-231
- Unterseher M. and Schnittler M. 2009. Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) – Different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycological Research* 113: 645-654.
- Usuki F., Narisawa K., Yonezawa M., Kakishima M. and Hashiba T. 2002 An efficient inoculation method for colonization of Chinese cabbage seedlings by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. *Journal of General Plant Pathology* 68, 326-32.
- Van Gent-Pelzer M.P.E., Van Brouwershaven I.R., Kox L.F.F. and Bonants P.J.M. 2007. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. *J. Phytopathol.* 155: 357-363.
- Varela H. “Producción de enzimas depilantes de pieles” Tesis para optar por el título de Doctor en Química. 1998. Facultad de Química. Universidad de la República. Uruguay.
- Vega F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate Pathology* 98: 277-279.

-Vega F.E., Posada F., Aime M.C., Pava-Ripoll M., Infante F. and Rehner S.A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control* 46: 72-82.

-Vega F.E., Goettel M.S., Blackwell M., Chandler D., Jackson M.A., Keller S., Koike M., Maniania M., Monzón A., Ownley B.H., Pell J.K., Rangel D.E.N. and Roy H.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2:149-159

-Verma, O.P. and Gupta, R.B.L. 2008. New Disease Rep.
<http://www.bspp.org.uk/NDR/jan2008/2007-96.asp>

-Vilgalys R. and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping and enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.

-Wang C.S. and St. Leger R.J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects; the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6(5):808-816

-Wang H., Gloer K.B., Gloer J.B., Scott J.A. and Malloch D. 1997. Anserinones a and b: new antifungal and antibacterial benzoquinones from the coprophilous fungus *Podospora anserina*. *J. Nat. Prod.* 60, 629-631.

-Wang Y. and Guo L.D. 2007. A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Canadian Journal of Botany* 85: 911-917.

-West-Eberhard M.J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution.*, Oxford University Press, New York.

-Whalley A.J.S. 1996. The xylariaceous way of life. *Mycol Res* 100:897-922.

-White J.F.J. 1987. The widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Disease* 71: 340-342.

-White J. F., Reddy P.V. and Bacon C. W. 2000. Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal. In: *Microbial Endophytes*. C. W. Bacon and J. F. White, eds. Marcel Dekker, New York, USA. 49-62.

-White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (eds: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. Academic Press, San Diego: 315-322.

-Wilson D. 1995. Endophyte; The Evolution of a Term, and Clarification of its Use and Definition. *Oikos*; 73:274-276.

-Zhang C., Xia Y. and Li Z. 2011. Identification of Genes Differentially Expressed

by *Metarhizium anisopliae* Growing on *Locusta migratoria* Wings Using Suppression Subtractive Hybridization. *Curr Microbiol* (2011) 62:1649-1655

- Zhao J. H., Zhang Y. L., Wang L. W., Wang J. Y. and Zhang C. L. 2012. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2107-2112.

-Zou W. X., Meng J. C., Lu H., Cheng G. X., Shi G. X., Zhang T. Y. and Tan R. X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *J. Nat. Prod.*, 63: 1529 -1530.

10. ANEXOS

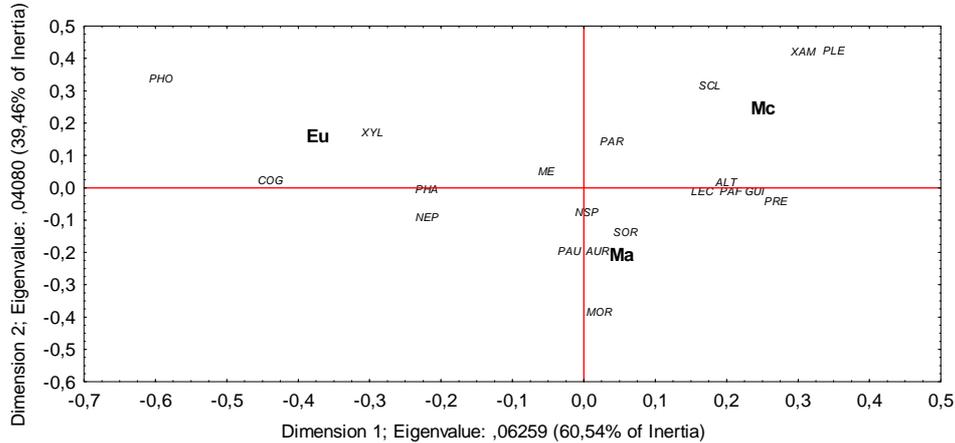
Anexo I: Lista de hongos endófitos identificados por métodos moleculares

Taxa	Secuencias Identific.	Coincidencia más cercana	Cobertura	Máxima identidad
<i>Anthostomella</i> sp. Sacc.	ITS	<i>Anthostomella eucalyptorum</i> (AM922205.1)	92%	97%
Ascomycota (Fungal endophyte)	ITS - LSU	Fungal endophyte (EF420054.1, LSU)	100% (LSU)	98% (LSU)
	ITS	Ascomycota (HQ008925.1)	99%	99%
<i>Coniochaeta velutina</i> (Fuckel) Cooke	ITS - LSU	<i>Coniochaeta velutina</i> (FJ167402.1, LSU)	100% (LSU)	100% (LSU)
<i>Conoplea fusca</i> Pers.	ITS - LSU	<i>Conoplea fusca</i> (EU552114.1, LSU)	100% (LSU)	99% (LSU)
<i>Corynespora</i> sp. Güssow	ITS	<i>Corynespora cassicola</i> (GQ407100.1)	56%	100%
<i>Daldinia</i> sp. Ces. & De Not.	ITS - LSU	<i>Daldinia childiae</i> (EF562505.1, LSU)	85% (LSU)	94% (LSU)
<i>Diaporthe</i> sp. Nitschke	ITS	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (HQ328006.1)	100%	99%
<i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy	ITS	<i>Guignardia mangiferae</i> (HM751801.1)	100%	100%
<i>Lecythophora fasciculata</i> (J.F.H. Beyma) E. Weber, Görke & Begerow	ITS	<i>Lecythophora fasciculata</i> (GQ377492.1)	100%	99%
	ITS - LSU	<i>Lecythophora fasciculata</i> (AB190422.1, LSU)	100% (LSU)	100% (LSU)
<i>Lentinus tigrinus</i> (Bull.) Fr.	ITS - LSU	<i>Lentinus tigrinus</i> (AY615974.1, LSU)	100% (LSU)	100% (LSU)
<i>Lophiostoma</i> sp. Ces. & De Not	ITS - LSU	<i>Lophiostoma hysterooides</i> (AB619019.1, LSU) (GQ254683.1, ITS)	98% (LSU) 100% (ITS)	99% (LSU) 91% (ITS)
	ITS	<i>Lophiostoma cynaroidis</i> (EU552138.1)	97%	93%
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	ITS	<i>Metarhizium anisopliae</i> (JN379352.1)	100%	100%
<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> Crous	ITS	<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> (EU715661.1)	98%	99%
<i>Morinia pestalozzioides</i> Berl. & Bres.	ITS	<i>Morinia pestalozzioides</i> (AY929325.1)	100%	99%
<i>Neofusicoccum australe</i> (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips	ITS	<i>Neofusicoccum australe</i> (EU375516.1)	99%	99%
<i>Neofusicoccum parvum</i> (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips	ITS	<i>Neofusicoccum parvum</i> (IQ647911.1)	100%	100%
<i>Paraconiothyrium fungicola</i> Verkley & Wicklow	ITS	<i>Paraconiothyrium fungicola</i> (AY642532.1)	99%	99%
<i>Peyronellaea australis</i> Aveskamp, Gruyter & Verkley	ITS	<i>Peyronellaea australis</i> (GU237915.1)	99%	100%
<i>Peziza varia</i> (Hedw.) Fr.	ITS	<i>Peziza varia</i> (AF491556.1)	100%	100%
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich	ITS	<i>Phlebiopsis gigantea</i> (JQ781782.1)	100%	100%
" <i>Phomopsis micheliae</i> " C.Q. Chang, Z.D. Jiang & P.K. Chi	ITS	" <i>Phomopsis micheliae</i> " (AY620820.1)	100%	98%
<i>Phomopsis</i> spp. (Sacc) Bubák	ITS	<i>Phomopsis</i> sp. (EF687936.1)	100%	99%
	ITS	<i>Phomopsis</i> sp. (JN418789.1)	100%	99%
	ITS	<i>Phomopsis</i> sp. (JN153070.1)	100%	99%
	ITS	<i>Phomopsis</i> sp. (FJ009548.1)	96%	99%
	ITS	<i>Phomopsis</i> sp. (JN153071.1)	100%	99%
	ITS	<i>Phomopsis</i> sp. (JQ936281.1)	100%	97%

Pleosporales Luttr. ex M.E. Barr	ITS	Pleosporales (EF672298.1)	100%	99%
	ITS	Uncult. Pleosporales (GU911134.1)	99%	99%
	ITS	Uncult. Pleosporales (GU910876.1)	100%	99%
<i>Preussia africana</i> Arenal, Platas & Peláez	ITS	<i>Preussia africana</i> (EU551195.1)	100%	100%
	ITS	<i>Preussia africana</i> (JQ354929.1)	100%	100%
	ITS	<i>Preussia africana</i> (JN418768.1)	94%	99%
<i>Preussia australis</i> (Speg.) Arx	ITS	<i>Preussia australis</i> (EU551297.1)	100%	100%
<i>Preussia minima</i> (Auersw.) Arx	ITS-LSU	<i>Preussia minima</i> (GQ2037444.1,LSU)	100% (LSU)	99% (LSU)
<i>Preussia</i> sp. Fuckel	ITS	<i>Preussia</i> sp. (JQ354929.1)	100%	100%
	ITS	<i>Preussia</i> sp. (JN159709.1)	100%	100%
	ITS	<i>Preussia</i> sp. (JN225886.1)	100%	99%
	ITS	<i>Preussia</i> sp. (HQ130702.1)	100%	99%
	ITS	<i>Preussia</i> sp. (HQ607945.1)	100%	97%
	ITS	<i>Preussia</i> sp. (HQ607932.1)	100%	99%
Sarcosomataceae Kobayasi	ITS	Sarcosomataceous endophyte (AF485074.1)	100%	98%
<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> (Ellis & Everh.) Huhndorf	ITS	<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> (DQ286768.1)	100%	99%
	ITS	<i>Sclerostagonospora opuntiae</i> (FJ605260.1)	99%	98%
<i>Sporormiella</i> sp. Ellis & Everh.	ITS	<i>Sporormiella</i> sp. (HQ829154.1)	100%	99%
<i>Xylaria acuta</i> Peck	ITS - LSU	<i>Xylaria acuta</i> (AY544676.1, LSU)	100% (LSU)	98% (LSU)
<i>Xylaria digitata</i> (L.) Grev.	ITS	<i>Xylaria digitata</i> (GU322456.1)	100%	99%
<i>Xylaria enteroleuca</i> (Speg.) P.M.D. Martin	ITS	<i>Xylaria enteroleuca</i> (FJ205471.1) (FJ205467.1)	100%	99%
<i>Xylaria hypoxylon</i> (L.) Grev.	ITS	<i>Xylaria hypoxylon</i> (FJ205468.1)	100%	100%
<i>Xylaria</i> sp. Hill ex Schrank	ITS	<i>Xylaria</i> sp. (EU010000.1)	100%	99%
Xylariales (Amphisphaeriaceae) G. Winter	ITS	Amphisphaeriaceae (DQ872671.1)	100%	100%
	ITS	Amphisphaeriaceae (JN545792.1)	100%	99%
	ITS	Xylariales (HE608800.1)	99%	99%
Xylariales (Xylariaceae) Tul. & C. Tul.	ITS	Xylariaceae (DQ272570.1)	100%	97%
	ITS - LSU	Xylariaceae (HM595600.1, LSU)	100% (LSU)	97% (LSU)
	ITS - LSU	Xylariaceae (FJ425708.1, LSU)	100% (LSU)	99% (LSU)

Anexo II. Análisis de correspondencias. Contribución de las especies a la inercia de los ejes.

II.A.) Análisis de correspondencias con las 3 plantas.
Con 20 spp. (Transformados con log+1) (Figura 16)



Eigenvalues and Inertia for all Dimensions (plantas.log+1.sta)

Input Table (Rows x Columns): 3 x 20

Total Inertia=,10339 Chi²=10,007 df=38 p=1,0000

	Singular Values	Eigen-Values	Perc. of Inertia	Cumulatv Percent	Chi Squares
1	,250182	,062591	60,54027	60,5403	6,058099
2	,201981	,040796	39,45973	100,0000	3,948627

Column Coordinates and Contributions to Inertia

Input Table (Rows x Columns): 3 x 20

Standardization: Row and column profiles

	Column Number	Coordin. Dim.1	Coordin. Dim.2	Mass	Quality	Relative Inertia	Inertia Dim.1	Cosine ² Dim.1	Inertia Dim.2	Cosine ² Dim.2
ALT	1	,197801	-,024449	,052087	1,000000	,020013	,032559	,984952	,000763	,015048
AUR	2	-,021821	-,235917	,039727	1,000000	,021569	,000302	,008483	,054197	,991517
COG	3	-,439544	-,018739	,055550	1,000000	,103994	,171465	,998186	,000478	,001814
GUI	4	,198202	-,052395	,053264	1,000000	,021653	,033430	,934683	,003584	,065317
LEC	5	,164573	-,052021	,049586	1,000000	,014288	,021457	,909160	,003289	,090840
MOR	6	,021018	-,425640	,048458	1,000000	,085122	,000342	,002432	,215194	,997568
NEP	7	-,220357	-,132696	,045947	1,000000	,029405	,035645	,733877	,019831	,266123
NSP	8	,002998	-,115387	,057016	1,000000	,007347	,000008	,000674	,018607	,999326
PAR	9	,037626	,101080	,047075	1,000000	,005297	,001065	,121697	,011790	,878303
PHA	10	-,220895	-,045934	,040854	1,000000	,020115	,031849	,958552	,002113	,041448
PHO	11	-,592713	,296414	,057097	1,000000	,242537	,320472	,799938	,122967	,200062
PLE	12	,310788	,383241	,048810	1,000000	,114941	,075323	,396731	,175725	,603269
PAF	13	,183852	-,051827	,051614	1,000000	,018216	,027874	,926384	,003398	,073616
PAU	14	-,021821	-,235917	,039727	1,000000	,021569	,000302	,008483	,054197	,991517
PRE	15	,267833	-,082336	,064660	1,000000	,049104	,074106	,913655	,010745	,086345
SCL	16	,175404	,273959	,040854	1,000000	,041816	,020082	,290744	,075160	,709256
SOR	17	,056989	-,179423	,043965	1,000000	,015071	,002281	,091639	,034693	,908361
XYL	18	-,297845	,130279	,053824	1,000000	,055019	,076285	,839402	,022392	,160598
XAM	19	,305736	,379163	,048458	1,000000	,111195	,072368	,394010	,170764	,605990
ME	20	-,053269	,008590	,061427	1,000000	,001730	,002785	,974657	,000111	,025343

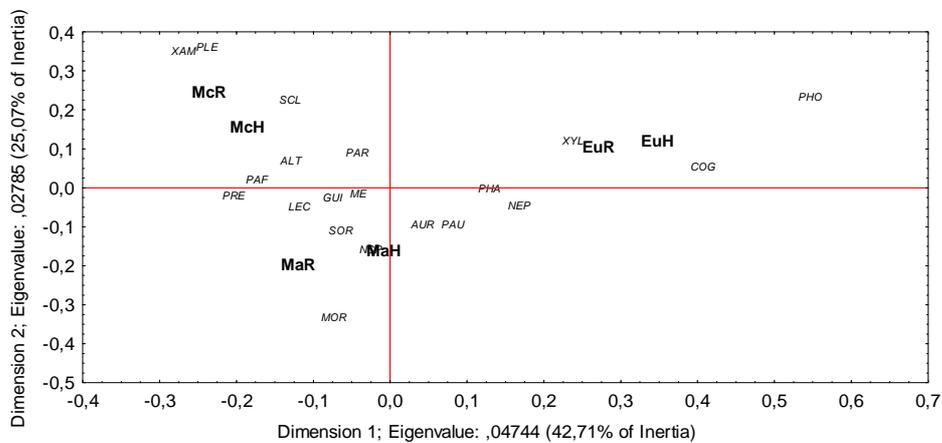
Row Coordinates and Contributions to Inertia

Input Table (Rows x Columns): 3 x 20

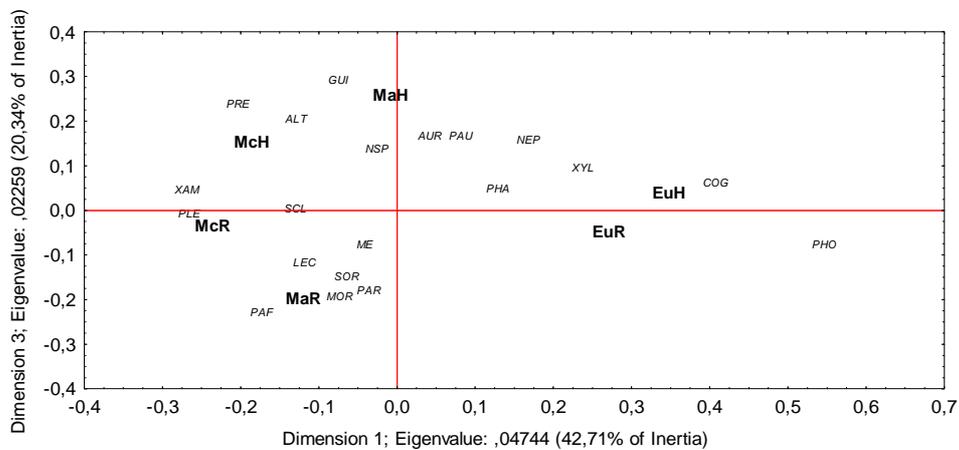
Standardization: Row and column profiles

	Row Number	Coordin. Coordin.		Mass	Quality	Relative Inertia	Cosine ²		Inertia	
		Dim.1	Dim.2				Dim.1	Dim.2	Dim.1	Dim.2
Eu	1	-,372352	,106349	,286340	1,000000	,415317	,634276	,924577	,079383	,075423
Mc	2	,251685	,190756	,344354	1,000000	,332183	,348504	,635149	,307141	,364851
Ma	3	,054022	-,260326	,369305	1,000000	,252500	,017219	,041286	,613476	,958714

II.B.) Análisis de correspondencias con órganos(hoja, rama) de las 3 especies de plantas. Con 20 spp.
(Transformados con log+1) Ejes 1 - 2 (Figura 17)



Análisis de correspondencias con órganos(hoja, rama) de las 3 especies de plantas. Con 20 spp. (Transformados con log+1)
Ejes 1 - 3 (Figura 18)



Eigenvalues and Inertia for 3 Dimensions (órganos.log+1.sta)

Input Table (Rows x Columns): 6 x 20

Total Inertia=,11107 Chi²=18,351 df=95 p=1,0000

	Singular Values	Eigen-Values	Perc. of Inertia	Cumulatv Percent	Chi Squares
1	,217805	,047439	42,70890	42,7089	7,837469
2	,166876	,027848	25,07109	67,7800	4,600771
3	,150291	,022587	20,33538	88,1154	3,731725

Column Coordinates and Contributions to Inertia

Input Table (Rows x Columns): 6 x 20

Standardization: Row and column profiles

	Column Number	Coordin. Dim.1	Coordin. Dim.2	Coordin. Dim.3	Mass	Quality	Relative Inertia	Inertia Dim.1	Cosine² Dim.1	Inertia Dim.2	Cosine² Dim.2	Inertia Dim.3	Cosine² Dim.3
ALT	1	-,130439	,037055	,174196	,050852	,976196	,022854	,018239	,340833	,002507	,027505	,068316	,607859
AUR	2	,041222	-,127965	,136231	,041432	,772417	,017691	,001484	,035829	,024363	,345270	,034043	,391318
COG	3	,406792	,020555	,031219	,056318	,969013	,087318	,196455	,960900	,000854	,002453	,002430	,005659
GUI	4	-,075768	-,059185	,262123	,049363	,864069	,040093	,005974	,063634	,006209	,038828	,150156	,761607
LEC	5	-,119545	-,082148	-,147717	,047208	,428578	,042503	,014221	,142903	,011440	,067481	,045605	,218194
MOR	6	-,073951	-,365742	-,221843	,050495	,986345	,086856	,005821	,028623	,242555	,700134	,110021	,257588
NEP	7	,166970	-,078913	,127149	,045076	,732022	,027870	,026491	,405943	,010080	,090675	,032263	,235405
NSP	8	-,026212	-,192043	,107480	,054048	,902465	,026484	,000783	,012624	,071579	,677599	,027642	,212242
PAR	9	-,044115	,057741	-,208921	,045258	,798953	,024952	,001857	,031779	,005418	,054442	,087455	,712732
PHA	10	,128013	-,035626	,017569	,042093	,415783	,016374	,014541	,379264	,001919	,029375	,000575	,007144
PHO	11	,545756	,199002	-,105784	,061379	,980285	,196533	,385377	,837472	,087287	,111349	,030409	,031464
PLE	12	-,267321	,327804	-,036708	,052257	,967278	,087676	,078718	,383451	,201642	,576597	,003117	,007230
PAF	13	-,174721	-,012945	-,257886	,049558	,964026	,044986	,031891	,302769	,000298	,001662	,145915	,659596
PAU	14	,041222	-,127965	,136231	,041432	,772417	,017691	,001484	,035829	,024363	,345270	,034043	,391318
PRE	15	-,204504	-,054237	,209751	,063006	,990270	,050842	,055546	,466600	,006656	,032820	,122722	,490850
SCL	16	-,130964	,193463	-,024910	,044192	,999496	,021973	,015978	,310560	,059395	,677700	,001214	,011235
SOR	17	-,065516	-,142472	-,179251	,045076	,957053	,024052	,004079	,072424	,032856	,342490	,064122	,542139
XYL	18	,236499	,088299	,065744	,048625	,511125	,058284	,057330	,420100	,013614	,058561	,009305	,032464
XAM	19	-,269829	,317131	,015263	,053124	,986061	,084208	,081533	,413521	,191858	,571217	,000548	,001323
ME	20	-,041991	-,049003	-,107160	,059206	,401781	,020760	,002201	,045274	,005105	,061656	,030100	,294851

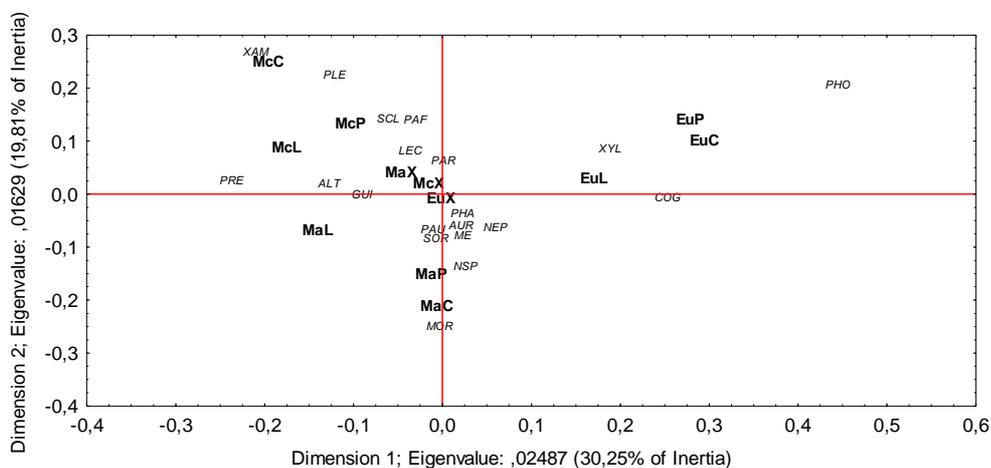
Row Coordinates and Contributions to Inertia

Input Table (Rows x Columns): 6 x 20

Standardization: Row and column profiles

	Row Number	Coordin. Dim.1	Coordin. Dim.2	Coordin. Dim.3	Mass	Quality	Relative Inertia	Inertia Dim.1	Cosine² Dim.1	Inertia Dim.2	Cosine² Dim.2	Inertia Dim.3	Cosine² Dim.3
Eu H	1	,347759	,079897	,003590	,153717	,874892	,201415	,391873	,830942	,035237	,043861	,000088	,000089
Eu R	2	,271069	,064608	-,083878	,149412	,782642	,145556	,231426	,679047	,022396	,038576	,046539	,065019
Mc H	3	-,186070	,114934	,116565	,178530	,770508	,128122	,130295	,434334	,084688	,165719	,107394	,170455
Mc R	4	-,235815	,204202	-,071356	,167649	,887391	,174166	,196520	,481905	,251034	,361361	,037791	,044125
Ma H	5	-,008444	-,201105	,222206	,187021	,943793	,160365	,000281	,000749	,271611	,424630	,408823	,518414
Ma R	6	-,119907	-,238755	-,234765	,163671	,979090	,190376	,049605	,111284	,335034	,441216	,399365	,426590

II.C.) Análisis de correspondencias con tejidos y órganos de las 3 especies de plantas. Con 20 spp.
(Transformados con log+1) (Figura 19)



Eigenvalues and Inertia for 3 Dimensions (tejidos.log+1.sta)

Input Table (Rows x Columns): 12 x 20

Total Inertia=.08222 Chi²=23,657 df=209 p=1,0000

	Singular Values	Eigen-Values	Perc. of Inertia	Cumulatv Percent	Chi Squares
1	,157704	,024870	30,24740	30,2474	7,155658
2	,127619	,016287	19,80773	50,0551	4,685934
3	,115230	,013278	16,14860	66,2037	3,820291

Column Coordinates and Contributions to Inertia

Input Table (Rows x Columns): 12 x 20

Standardization: Row and column profiles

	Column Number	Coordin.		Mass	Quality	Relative Inertia	Cosine ²		Inertia	Cosine ²
		Dim.1	Dim.2				Dim.1	Dim.2		
ALT	1	-,128465	-,004776	,050433	,336746	,030102	,033466	,336281	,000071	,000465
AUR	2	,020108	-,083619	,044412	,285839	,013977	,000722	,015626	,019067	,270214
COG	3	,252943	-,032152	,053193	,454689	,092501	,136840	,447459	,003376	,007230
GUI	4	-,091197	-,025511	,049993	,112366	,048524	,016718	,104211	,001998	,008155
LEC	5	-,037377	,057045	,047961	,046056	,058908	,002694	,013834	,009583	,032223
MOR	6	-,003873	-,275336	,050089	,580896	,079518	,000030	,000115	,233155	,580781
NEP	7	,038140	-,088516	,046841	,292387	,018100	,002740	,045785	,022534	,246602
NSP	8	,004436	-,161916	,052410	,486677	,034362	,000041	,000365	,084365	,486312
PAR	9	-,000117	,037149	,046841	,042863	,018342	,000000	,000000	,003969	,042863
PHA	10	,021555	-,060898	,045024	,120533	,018959	,000841	,013419	,010252	,107114
PHO	11	,444265	,180490	,056792	,864529	,183716	,450705	,742051	,113597	,122478
PLE	12	-,122559	,200120	,048359	,457967	,070722	,029207	,124917	,118913	,333050
PAF	13	-,056522	,115660	,044645	,467868	,019232	,005735	,090193	,036670	,377674
PAU	14	-,011734	-,090951	,045458	,385057	,012075	,000252	,006304	,023089	,378753
PRE	15	-,237780	,000291	,063268	,523859	,083047	,143830	,523859	,000000	,000001
SCL	16	-,061996	,117351	,045893	,627567	,015666	,007092	,136932	,038805	,490635
SOR	17	-,008389	-,109752	,046737	,309573	,022246	,000132	,001798	,034567	,307775
XYL	18	,187278	,060431	,050969	,419517	,057221	,071878	,379955	,011429	,039562
XAM	19	-,211041	,243520	,054148	,807926	,084640	,096968	,346528	,197160	,461398
ME	20	-,006921	-,103801	,056533	,195090	,038142	,000109	,000863	,037400	,194227

Row Coordinates and Contributions to Inertia

Input Table (Rows x Columns): 12 x 20

Standardization: Row and column profiles

	Row Number	Coordin. Coordin.		Mass	Quality	Relative Inertia	Cosine ²		Inertia Dim.2	Cosine ² Dim.2
		Dim.1	Dim.2				Dim.1	Dim.2		
Eu L	1	,171415	-,000809	,079517	,371530	,076486	,093945	,371522	,000003	,000008
Eu P	2	,279244	,110836	,080715	,716264	,123706	,253070	,618781	,060882	,097484
Eu C	3	,295366	,071945	,083292	,755165	,123970	,292173	,712870	,026472	,042296
Eu X	4	-,000685	-,038798	,072829	,057603	,023154	,000001	,000018	,006731	,057585
Mc L	5	-,174758	,058200	,082161	,501819	,067557	,100891	,451719	,017087	,050100
Mc P	6	-,103038	,102317	,090363	,264475	,087619	,038575	,133166	,058084	,131309
Mc C	7	-,195179	,219934	,093765	,672598	,146601	,143623	,296330	,278483	,376268
Mc X	8	-,015261	-,010280	,072651	,017409	,017184	,000680	,011975	,000471	,005434
Ma L	9	-,140364	-,098828	,087958	,392281	,080361	,069679	,262267	,052747	,130014
Ma P	10	-,012757	-,180035	,096907	,499715	,076829	,000634	,002497	,192859	,497219
Ma C	11	-,006679	-,241500	,085354	,452108	,134014	,000153	,000346	,305651	,451763
Ma X	12	-,046856	,010750	,074487	,049239	,042519	,006575	,046777	,000529	,002462