

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* : Dinámica de las poblaciones fúngicas

Cabral, Daniel

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cabral, Daniel. (1982). Contribución al estudio de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* : Dinámica de las poblaciones fúngicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1747_Cabral.pdf

Cita tipo Chicago:

Cabral, Daniel. "Contribución al estudio de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* : Dinámica de las poblaciones fúngicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1747_Cabral.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FILOSFERA DE
EUCALYPTUS VIMINALIS

- DINAMICA DE LAS POBLACIONES FUNGICAS -

Daniel Cabral

- 1982 -

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FILOSFERA DE
EUCALYPTUS VIMINALIS

- DINAMICA DE LAS POBLACIONES FUNGICAS -

Daniel Cabral

Tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Jorge E. Wright

1747

A mis padres

A Silvia

Por su esfuerzo y comprensión

INDICE

| | | |
|--|------|----|
| INTRODUCCION | pág. | 1 |
| ANTECEDENTES | " | 4 |
| 1. Los microorganismos saprófitos en el filopleno | " | 4 |
| 1.1. Composición de la microflora y técnicas de estudio ... | " | 4 |
| 1.2. Nutrición | " | 20 |
| 1.3. Factores que controlan la comunidad | " | 22 |
| 1.3.1. El hospedante y su ubicación geográfica | " | 22 |
| 1.3.2. Edad y estado fisiológico de la hoja | " | 25 |
| 1.3.3. Estaciones del año | " | 31 |
| 1.3.4. Posición de la hoja sobre la planta | " | 32 |
| 1.3.5. Patógenos | " | 33 |
| 1.4. El papel de los saprófitos sobre la planta | " | 34 |
| 2. Los microorganismos endofilos | " | 36 |
| 3. Modelos de colonización | " | 42 |
| OBJETIVOS | " | 51 |
| MATERIALES Y METODOS | " | 53 |
| 1. Sitio de muestreo | " | 53 |
| 1.1. Ubicación geográfica | " | 53 |
| 1.2. Clima | " | 53 |
| 2. Muestreo | " | 58 |
| 3. Procesamiento de las muestras | " | 59 |
| 3.1. Métodos de aislamiento | " | 59 |
| 3.1.1. Lavado seriado de la superficie de la hoja | " | 60 |
| 3.1.2. Esterilización de la superficie de la hoja | " | 62 |
| 3.1.3. Aislamiento | " | 63 |
| 3.1.4. Identificación de las cepas | " | 63 |
| Cultivo en diversos medios semi-sintéticos | " | 63 |
| Inoculación sobre hojas | " | 64 |
| Irradiación de los cultivos con luz UV | " | 64 |
| Identificación de cepas a partir del sustrato natural | " | 65 |

| | | |
|---|------|-----|
| 3.2. Métodos de observación directa | pág. | 66 |
| 3.2.1. Microscopio electrónico de barrido (MEB) | " | 66 |
| 3.2.2. Observación de fructificaciones sobre el sustrato | " | 67 |
| RESULTADOS | " | 69 |
| 1. Métodos de aislamiento | " | 69 |
| 1.1. Identificación de las cepas | " | 69 |
| 1.1.1. Cultivo en diversos medios semi-sintéticos | " | 75 |
| 1.1.2. Inoculación sobre hojas | " | 75 |
| 1.1.3. Irradiación de los cultivos con luz UV | " | 75 |
| 1.1.4. Identificación de cepas a partir del sustrato natural | " | 76 |
| 1.2. Análisis de las poblaciones fúngicas en función de su relación con el hospedante | " | 76 |
| 1.3. Análisis de las poblaciones fúngicas en función de los estadios de la hoja y de las estaciones del año | " | 79 |
| 1.4. Análisis de la comunidad de la filosfera en función de los estadios de la hoja y de las estaciones del año. | " | 82 |
| 1.4.1. Análisis de los datos por métodos estadísticos .. | " | 94 |
| Análisis de los datos por el W.P.G.M. | " | 94 |
| Análisis de los datos por el AN.FA.CO. | " | 101 |
| 2. Métodos de observación directa | " | 103 |
| 2.1. Análisis de la densidad fúngica con MEB | " | 103 |
| 2.2. Observación de fructificaciones sobre el sustrato | " | 110 |
| CONCLUSIONES Y DISCUSION | " | 113 |
| BIBLIOGRAFIA | " | 124 |

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jorge E. Wright bajo cuya dirección se realizó este trabajo, por su permanente apoyo e interés y, sobre todo, por su capacidad para transmitir su propio entusiasmo por la micología, base primordial de un verdadero Maestro.
- A la Ing. Agr. Marta B. Collantes por su cordial asesoramiento ecológico e interpretación de los resultados estadísticos.
- A la Dra. María E. Renalli de Cinto por su colaboración en la identificación de materiales y, junto a todos los integrantes de la Cátedra de Introducción a la Botánica que ella dirige, por facilitarme la transcripción dactilográfica del manuscrito original.
- A la firma Fiplasto S.A. en las personas del Ing. Agr. W. Barret, Gerente Forestal, Ing. Agr. Juan E. Spinetto, Jefe Forestal y del Pto. Agr. O. A. Gorostiza, Jefe de Sección Agrícola, por facilitarme el acceso a las plantaciones de la firma y los datos técnicos necesarios.
- A la Dra. Irma J. Gamundí, por sus valiosas sugerencias en la lectura crítica de los primeros resultados de este trabajo.
- Al Dr. J. A. Hoffmann por poner a mi disposición sus trabajos sobre el clima de la zona costera de los ríos Paraná y de la Plata.
- Al Director de la Estación Experimental del INTA de San Pedro, Ing. Agr. M. Lozada, por facilitarme los datos meteorológicos.
- Al CONICET por otorgarme la beca de Perfeccionamiento en la Investigación y los subsidios necesarios, gracias a los cuales pude reali-

zer este trabajo.

- A la Lic. Sonia Mac Carthy por su colaboración en la identificación de cepas y por su valiosa ayuda técnica.
- A la Lic. Susana Martínez por su asesoramiento sobre la morfología foliar.
- A la Sta. Casilde Pardo y Sr. Emilio del Busto, por su inestimable colaboración técnica.
- A la Dra. María C. I. Maggese por la traducción de trabajos del alemán.
- Al Ing. D. Almonacid del Centro de Cómputos de Salud de la USA, por el procesamiento de los datos.
- Al Ing. Agr. Hector D. Ginzo por la realización del análisis estadístico.
- A la firma Producción y Consumo por la fotoduplicación de los originales
- A mis amigos y compañeros de la Facultad gracias a cuyo apoyo y amistad fue posible la realización de este trabajo.

INTRODUCCION

Las estructuras aéreas de las plantas, y las hojas en particular, proporcionan un habitat en donde se desarrolla una variada flora microbiana. Dicha flora está compuesta por organismos que, de acuerdo a su ubicación en el sustrato, pueden ser epifitos o endofitos y, de acuerdo a su tipo de nutrición o relación con el hospedante, parásitos, parásitos débiles o saprófitos. Los parásitos, tanto epifitos como endofitos, han sido estudiados bajo múltiples aspectos desde el comienzo de los estudios fitopatológicos. Sin embargo, a pesar que desde los trabajos de Hiltner (1903) se aceptaba que el equilibrio hospedante-patógeno en la raíz, estaba influenciado por los saprófitos de la rizosfera, los saprófitos y parásitos débiles de las hojas y otras estructuras aéreas de las plantas, comienzan a ser estudiados sólo a partir de mediados de siglo (Last & Warren, 1972). Los trabajos de Last (1955) y Ruinen (1956) fueron fundamentales en el desarrollo de estas investigaciones. Ambos autores, casi simultáneamente, proponen el término "filosfera", en analogía al término rizosfera, para indicar la superficie de la hoja como un habitat donde se desarrolla una flora particular. Esta flora está constituida principalmente por saprófitos, pero involucra también a los parásitos y parásitos débiles epifilos, y a los endofilos que deben pasar un período crítico sobre la superficie de la hoja, hasta que se den las condiciones para la colonización.

Kerling (1958) propone el uso de "filoplano" en reemplazo de filosfera, como un término más correcto para señalar que el área en estudio es únicamente la que se encuentra en contacto directo con la superficie de la hoja. Señala que el entorno de la hoja no tiene propiedades físicas y químicas tales que permitan el desarrollo activo de una microflora, como ocurre con el suelo en el entorno de la raíz. En forma similar, Ruinen (1961) define filosfera como "la capa en contacto con la hoja y con la atmósfera, y sujeta a la influencia de ambas".

Diem (1973) propone una redefinición de dichos términos, basándose en observaciones de estimulación de la actividad microbiana por granos de polen, en la superficie de la hoja (Fokkema, 1968, 1971; Diem, 1970, 1973; Norse, 1972). Señala que los microorganismos de la filosfera serían aquellos que se desarrollan a nivel de la hoja, no sólo sobre la cutícula, sino también sobre otros soportes, como pueden ser los granos de polen. Utilizarían para su crecimiento todos los nutrientes disponibles, cualquiera sea su origen. El término filoplano quedaría entonces restringido sólo a aquellos organismos que se desarrollan sobre la cutícula, en ausencia de nutrientes exógenos a la hoja. Propone también los términos "palinoplano" para designar la región correspondiente a la superficie del grano de polen, y "palinosfera" a la región de influencia del polen como nutriente. En el momento en que los granos de polen están presentes sobre la hoja, su palinoplano y palinosfera se superponen y yuxtaponen con el filoplano, para formar la filosfera "sensu lato". Estas definiciones involucran más el concepto de nicho ecológico que el de habitat. Por otra parte, son de difícil aplicación práctica, ya que en la mayoría de los casos no es fácil delimitar el tipo de nutrición de estos organismos sobre la planta viva.

Carroll et al. (1977) incluyen en la filosfera a los endofilos y, por lo tanto, el interior de la hoja. Esta ampliación del término es válida si homologamos filosfera con la definición de "biosfera" dada por Densereau (1957), quien señala que es "aquella parte de la corteza terrestre y de la capa de aire circundante que está habitada por organismos vivos", aclarando que "en los trópicos, por ejemplo, la biosfera se extiende más profundamente en el suelo que en otras regiones". Font Quer (1965) amplía el espacio que comprende la filosfera, indicando que "es la masa, más o menos redondeada o no, del follaje de una planta o de un conjunto de plantas", señalando que "en la filosfera pueda formarse un micro clima especial, más o menos diferente del circundante".

Los términos filosfera y filoplano han sido usados indistinta-

mente en las investigaciones de este habitat, en algunos casos con excepciones diferentes, en otros concordantes.

En el presente trabajo utilizaremos filoplano según la definición de Kerling (1958), para señalar el habitat que ocupan los organismos epifitos en la hoja viva, y filosfera según Carroll et al. (1977), incluyendo a los endofilos.

En el filoplano se han observado principalmente bacterias, levaduras, hongos filamentosos con estadios levaduriformes, y hongos estrictamente filamentosos. En los trópicos, bajo condiciones de humedad y temperatura elevadas, se han registrado también algas, líquenes, flagelados, amebas, Myxomycetes, helechos y hasta fanerógamas (Ruinen, 1961). Las primeras investigaciones hacían suponer que hasta la senescencia, los únicos organismos activos en este habitat eran bacterias y levaduras, y que los hongos filamentosos se encontraban como propágulos inactivos. Estudios posteriores comprobaron la existencia de hongos filamentosos activos desde los primeros estadios del desarrollo de las hojas, y aún en las yemas.

Como consecuencia de los estudios del filoplano surge el estudio de los endofilos no patógenos o parásitos débiles. Estos trabajos pusieron en evidencia una alta frecuencia de endofilos, que no producían síntomas evidentes de infección, y que se ponen de manifiesto sólo a través de las técnicas de cultivo. Sin embargo, es sólo en los últimos cinco años que este importante grupo de organismos ha comenzado a ser estudiado con más intensidad.

ANTECEDENTES

1. Los microorganismos saprófitos en el filoplano

El estudio de los saprófitos en las estructuras aéreas de las plantas tuvo en sus comienzos dos enfoques: el de la microflora epifita de las estructuras vivas, y el de aquella que actúa en la senescencia y muerte de los tejidos. El primero fue iniciado por los fitopatólogos como consecuencia de la relación saprófito-parásito, que incide sobre la salud de la planta. El segundo, como una prolongación de las investigaciones sobre los organismos que actúan en el suelo descomponiendo los restos vegetales hasta la formación de humus.

Dickinson (1976) define a los organismos del filoplano como aquellos que son capaces de completar su ciclo de vida, o una parte significativa de él, sobre la hoja viva. Sin embargo, numerosas investigaciones han establecido que muchos de ellos actúan como descomponedores primarios, e inician la penetración de los tejidos en la senescencia de la hoja. Ello es consecuencia de los cambios químicos, enzimáticos y ultraestructurales que sobrevienen en esta etapa, y que disminuyen la resistencia del hospedante. Es imprescindible, entonces, el estudio global de estos dos aspectos, para obtener una visión completa del papel de los saprófitos en las estructuras aéreas de las plantas.

1.1. Composición de la microflora y técnicas de estudio

La presencia de organismos saprófitos sobre hojas y otras estructuras aéreas de las plantas se conoce desde hace más de un siglo. En 1868 de Bary describe Dematium pullulans (= Aureobasidium pullulans), como un hongo frecuente en este habitat. Treinta y cinco años más tarde, Burri (1903) demuestra la existencia de una flora bacteriana acti-

va sobre las hojas, sembrando el agua resultante del lavado de hojas y de la maceración de tejidos. Duggelli (1904) obtiene resultados semejantes, y demuestra que ciertas bacterias que acompañan a los frutos y semillas secas, se desarrollan sobre las hojas después de la germinación. Las especies registradas con mayor frecuencia fueron Pseudomonas trifolii y P. fluorescens.

Potter (1910) señaló la existencia de una flora líquénica epifila en los trópicos lluviosos. Paralelamente obtiene cultivos de hongos filamentosos, al presionar hojas vivas de Solanum sp. y Helianthus sp. sobre medio de gelatina en cajas de Petri. Entre los aislamientos más frecuentes cita a Penicillium sp. y Botrytis sp. Waller (1929) demostró que el filoplano alberga una flora bacteriana más diversa que la señalada hasta el momento. El desarrollo de algas fue observado por Palm (1934) que encontró Stomatocroon sp. en las cámaras subestomatales de una gran variedad de plantas tropicales. Keener (1950) estudió los hongos de las yemas foliares en varias especies arbóreas, por medio de técnicas de cultivo. Las yemas recién formadas tenían mayor frecuencia y número de especies que las que se encontraban en dormición.

En su trabajo sobre descomposición de hojarasca de Amelanchier sp. y Fagus sp., Smit & Wieringa (1953) investigaron los primeros estados del desarrollo de las hojas, y corroboraron la existencia de A. pullulans. La colonización del follaje por levaduras basidioespóricas de la familia Sporobolomycetaceae, fue señalada por Derx (1930). Lest (1955) estudió la ecología de estos organismos sobre hojas de trigo y cebada, poniendo énfasis en la importancia de este habitat para el desarrollo de organismos saprófitos. Utilizó el método de aislamiento por caída de esporas (Kluyver & van Niel, 1924; Derx, 1930; Buller, 1933) y registró como organismo más frecuente a Sporobolomyces roseus. Observó, además, la presencia de Cladosporium sp. sobre las hojas muertas.

Krowlik et al. (1955) estudiaron las bacterias del follaje de una gran variedad de plantas, y observaron que la gran mayoría eran

especies pigmentadas. En el filoplano de árboles y arbustos de varias localidades de Java, Sumatra y Banca, la flora bacteriana está representada principalmente por Beijerinckia spp., una bacteria fijadora de nitrógeno (Ruinen, 1956).

La mayoría de los investigadores restringen sus estudios a un grupo limitado de organismos, pero Kerling (1958), usando el método de lavado de hojas de Beta vulgaris, puso de manifiesto la existencia simultánea de bacterias, hongos con estadíos levaduriformes y hongos estrictamente filamentosos. Destaca que Cladosporium herbarum se encuentra tanto sobre hojas verdes como sobre senescentes y muertas.

Los trabajos realizados en la microflora aérea por Hirst (1953), Gregory y Hirst (1957) y, más tarde por Gregory (1971, 1973), estimularon los estudios del filoplano al demostrar que las esporas de los organismos saprófitos se encuentran en mayor cantidad que la de los parásitos. Estos resultados demostrarían que los saprófitos se desarrollan sobre las hojas vivas y senescentes, en mayor proporción que los patógenos (Last & Deighton, 1965).

Paralelamente a los estudios del filoplano se realizaron las primeras investigaciones sobre sucesión de organismos en tejidos senescentes y muertos sobre el nivel del suelo. Webster (1956, 1957) describió el patrón de colonización fúngica en vástagos florecidos de Dactylis glomerata. Usó técnicas de observación directa de las fructificaciones sobre vástagos, vainas y láminas. El primer grupo de hongos que aparece con la senescencia está formado por C. herbarum, Epicoccum purpureascens, Alternaria alternata y A. pullulans. Señaló que los primeros colonizadores son Hyphomycetes y Ascomycetes, en su gran mayoría anamorfos y teleomorfos de Loculoascomycetes. Al comparar con los resultados obtenidos en sustratos en el suelo (estiércol, hojarasca y humus), destacó la ausencia de Mucorales en la degradación de Dactylis glomerata por sobre el nivel del suelo. Propone que este tipo de investigaciones deben completarse con estudios de cultivo.

Pugh (1958), en el estudio de tejido senescente y muerto de Carex paniculata, cultivó pequeños trozos de tejido con previa esterilización superficial. Esta técnica le permitió poner en evidencia organismos que están actuando en la degradación interna del tejido, pero no fructificados en el momento del muestreo. Los primeros colonizadores de este sustrato fueron identificados como C. herbarum, Cephalosporium acremonium y Fusarium culmorum.

Hudson & Webster (1958) encontraron un patrón de colonización primaria semejante al de Webster (1956, 1957), en vástagos senescentes y muertos de Agropyron repens, que incluyen la vena y lámina de la hoja. Registraron la presencia de A. pullulans aún antes de que las hojas desarrollaran, y señalaron que el micelio de Cladosporium cladosporioides, A. alternata y E. purpurascens puede perdurar en condiciones vegetativas mucho tiempo después de la fructificación.

En su estudio de las levaduras del filoplano de plantas de pastura de Nueva Zelanda, di Menna (1959), sembró alícuotas de macerado de hojas, y registró como los más importantes colonizadores, a Rhodotorula sp. y Sporobolomycetaceae. Observó que estos organismos se disponen en grupos dentro de las depresiones de la pared celular. La misma autora (1960) estudiando el filoplano de Bryum antarctica en la Antártida, encontró que Cryptococcus sp. es más frecuente que Rhodotorula sp. en ese sustrato.

Voznyakoskaya & Khudyakov (1960) estudiaron la flora bacteriana del filoplano de 18 especies vegetales de Rusia, utilizando la técnica de aislamiento de Kerling (1958). Observaron que el número de bacterias aisladas dependía del medio de cultivo utilizado.

Ruinen (1961) realizó un valioso aporte al estudio del filoplano, analizando la flora en hojas vivas de diferentes edades, en gran variedad de plantas tropicales. Junto a otras técnicas usó la réplica de la superficie de las hojas con colodión o plástico soluble en agua. Estas réplicas, observadas en el microscopio óptico, permiten estudiar la distribución de los organismos sobre las hojas. Señala que el drenaje de agua a lo largo de las nervaduras causa una acumu-

lación de organismos que puede ser observada a ojo desnudo. Reconoce como colonizadores primarios a las bacterias, actinomicetes y hongos filamentosos. Posteriormente aparecen algas, levaduras y líquenes. Esta es una de las pocas investigaciones en que se menciona a los actinomicetes como integrantes de la flora del filoplano. Stout (1960) puntualizó que estos organismos que son muy frecuentes en el suelo, se encuentran muy raramente sobre las hojas vivas.

Meredith (1962) y Hudson (1962) estudiaron los hongos que aparecen a partir de la senescencia, en hojas de banana y caña de azúcar, respectivamente. La observación directa del material despues de 2-4 días en cámara húmeda indica que los colonizadores iniciales o saprófitos primarios, estarían ya presentes sobre las hojas verdes, pero fructificarían sobre las hojas senescentes.

Las técnicas usadas en los estudios precedentes, son inadecuadas para discriminar entre organismos epifitos y endofitos en los tejidos vivos; así como entre los vegetativamente activos, y aquellos que se encuentran en estado de esporas u otros propágulos inactivos en el filoplano. Kendrick & Burges (1962) estudiaron la sucesión fúngica en hojas vivas y hojarasca de Pinus silvestris, utilizando un conjunto de técnicas que les permitieron diferenciar estos estados de la micoflora. Los organismos en estado de micelio activo, fueron detectados utilizando la técnica desarrollada por Harley & Waid (1955) para el estudio de la microflora de raíces. Consiste en el lavado repetido de pequeños trozos de hoja, de tal manera que se eliminan las esporas de la superficie. El cultivo posterior de los trozos permite aislar organismos, preferentemente hongos filamentosos, que se encuentran vegetativamente activos.

Para diferenciar entre endofilos y epifilos, utilizaron la técnica de esterilización superficial de fragmentos de hoja (Davies, 1935), que ya fuera utilizada por Pugh (1958) en hojas senescentes y muertas. El empleo de estas técnicas de cultivo, complementadas con la observación directa de las fructificaciones sobre el material, les permitió obtener un amplio espectro de la relación de los hongos con el sustra-

to. Los resultados permitieron comprobar que, a pesar de no producir ningún síntoma de infección, Lophodermium pinastri se encuentra como endofilo en hojas verdes, y produce sus fructificaciones en la hojarasca; mientras que Coniosporium sp., y A. pullulans son organismos estrictos del filoplano.

Ruinen (1963) demostró que en el filoplano de árboles y arbustos de Indonesia, predominan las cepas coloreadas de levaduras, tal como fuera observado por Krowlik et al. (1955) en bacterias. Kerling (1964) realizó un estudio comparativo del filoplano de frutilla y centeno, aplicando el conjunto de técnicas de cultivo de Kendrick & Burgess (1962). Señaló la presencia de organismos que denomina "casuales o incidentales", que se encuentran presentes únicamente en forma de propágulos inactivos. Aisló 27 de estas especies por medio de la siembra de agua de lavado de hojas, entre las cuales Aspergillus sp., Botrytis sp., Cephalosporium sp., Fusarium sp., Stemphylium sp. y Phoma sp. son los géneros más frecuentes.

Last & Deighton (1965) realizaron una revisión de los trabajos relacionados con el filoplano. Analizaron las técnicas utilizadas hasta el momento, los organismos y su distribución, así como el papel que juegan los colonizadores saprófitos en la superficie de la hoja. Leben (1965) clasificó los organismos del filoplano en función de su estado de actividad sobre la hoja. Reconoce dos grupos, los colonizadores "casuales" (Kerling, 1964) y los "residentes" (figura I a).

La influencia que puede ejercer el habitat del hospedante en la microflora, fue estudiada por Dickinson (1965) en hojas de Halmione portulacoides, una planta que crece en pantanos salinos cercanos al mar. Las especies más frecuentes son las mismas que se aíslan en plantas de otros habitats, con excepción de Ascochyta obiones y Dendryphiella salina, esta última relacionada con suelos salinos (Pugh, 1962). El autor propone la clasificación de los hongos del filoplano en tres categorías, en función de la parte del ciclo de vida que dichos organismos cumplen en ese habitat (figura I b). Debido al tipo de técnicas utilizadas, sus resultados no permiten diferen-

ciar entre especies epifilas y endofilas.

Hogg & Hudson (1966) estudiaron los hongos de hojas adheridas al árbol y, hojaresca, de Fagus sylvatica. Establecieron un patrón de colonización basado en la sucesión de la aparición de las fructificaciones (figura II c). Demostraron que los organismos encontrados sobre la planta persisten durante un tiempo después que las hojas caen al suelo. Entre las especies aisladas con mayores frecuencias citan a: C. herbarum, A. alternata, B. cinerea, Discula quercina y A. pullulana. Consideraron a esta última como saprófita estricta, pero Frankland (1966) observó lesiones superficiales producidas por esta especie sobre pecíolos verdes de Pteridium aquilinum.

Utilizando un amplio rango de técnicas, Dickinson (1967), analizó la colonización fúngica de hojas de Pisum sp., desde antes que desarrollen hasta los últimos estadios de colonización sobre la planta. Para observar la distribución de los organismos, el número de esporas y la densidad hifal sobre las hojas, usó la técnica de impresión de la superficie, semejante a la utilizada por Ruinen (1961). Señala que esta técnica es más efectiva que la de aclaramiento de hojas (Issac, 1960; Jones, 1962; Hering & Nicholson, 1964), y que la de remoción de la cutícula con pectinasas (Preece, 1962), ya que estos últimos métodos son muy drásticos y modifican la distribución espacial.

Hudson (1968), en un trabajo ya clásico sobre la ecología de los hongos que actúan en las plantas por encima del nivel del suelo, realizó una amplia revisión del tema. Sugiere que los colonizadores primarios saprófitos que actúan en los primeros pasos de la degradación, pueden estar presentes inicialmente en el sustrato en forma vegetativa, como en el caso de la sucesión en estiércol. Por ello de gran importancia al uso de técnicas de aislamiento en este tipo de investigaciones. Estas son las únicas que pueden revelar la flora activa real en el momento del muestreo. Sin embargo, reata importancia a los saprófitos del filoplano, considerando que éstos se encuentran sólo en estado de propágulos que germinan en la senescencia, siendo allí donde actúan como colonizadores primarios (figura III b).

Utilizando únicamente técnicas de observación directa, Yadav (1968), estudió la micoflora que interviene en la descomposición de Urtica dioica. Sus resultados coinciden con los de Webster (1956, 1957) en Dactylis glomerata.

Pugh & Williams (1968) estudiaron los hongos asociados con la planta en su totalidad, en hojas, vástagos y raíces de Salsola kali. Compararon además, la flora de hojas y vástagos aéreos y enterrados. En las estructuras aéreas encontraron la misma asociación de hongos que reconoce Hudson (1968) en su segundo grupo (figura III b). En su mayoría se trata de especies diferentes a las halladas en las mismas estructuras enterradas, y en la raíz. Como ya fuera señalado para el caso de las bacterias (Krowlik et al., 1955), y levaduras (Ruinen, 1963), las estructuras aéreas se caracterizan por tener también una alta proporción de especies fúngicas dematiáceas. Nicot (1960), encontró que la mayoría de los hongos presentes en las dunas del Sahara, son miembros dematiáceos de los Hyphomycetes y Sphaeropsidales, o micelios estériles dematiáceos. Considera que la pigmentación del micelio y esporas es uno de los mecanismos de protección a la desecación, entre los que distingue: la formación de esporas multicelulares, formación de paredes gruesas, formación de picnidios y peritecios y, tendencia a formar clamidosporas. La mayoría de los hongos encontrados en las estructuras aéreas de Salsola kali tienen estas características, mientras que casi no existen en las especies de la parte enterrada y raíces. La formación de esporodoquios en E. purpurascens, un integrante común del filoplano, y los microesclerocios de Cladosporium spp., constituyen también mecanismos de protección a la desecación (Pugh, 1968). La presencia de pigmentos puede ser beneficiosa también en otros aspectos: los carotenoides permiten una mayor tolerancia a las radiaciones UV y/o favorecen la captación de energía (Last & Deighton, 1965; Codnor & Platt, 1959). Los pigmentos castaños, en su mayoría relacionados con la melanina, parecen tener un efecto de protección o filtro de luz, que es uno de los factores limitantes de la microflora del filoplano. La desaparición de los hongos de las

estructuras aéreas de las plantas cuando quedan enterradas, ya había sido registrada por Hogg (1966), en hojas enterradas de haya. C. herbarum es el ejemplo más conocido de disminución rápida de su frecuencia cuando la hoja cae al suelo.

El uso del microscopio electrónico de barrido (MEB), constituye un valioso aporte a las técnicas de observación directa. Barnes & Neve (1968) utilizan esta técnica para observar la distribución de Erysiphe polygoni sobre las hojas. Leben (1969) utiliza la misma técnica para estudiar la distribución espacial de las poblaciones de bacterias sobre las estípulas de las yemas de plantas de soja.

Lamb & Brown (1970) estudiaron comparativamente la micoflora no parásita de hojas de Paspalum dilatatum, Eucalyptus stellulata y Salix babylonica. Entre las técnicas utilizadas adopta la de clarificación y tinción de hojas, de Shipton & Brown (1962), para observar la distribución de los hongos sobre las hojas.

Uno de los pocos estudios de la filosfera en el hemisferio sur, es el de Ruscoe (1971), que estudió la micoflora de hojas vivas, senescentes y muertas de Nothofagus truncata en Australia. El uso de una variada gama de técnicas le permitió corroborar el modelo de Hudson (1968), (figura III b). El grupo 1 está representado en este caso por Pestalotia funerea, Tubercularia sp. y Stachylidium sp. También se encuentra representado el grupo 2, con excepción de Botrytis cinerea. Sin embargo, el inicio de la actividad de los integrantes de este segundo grupo, no coincide con la senescencia como lo propone Hudson (op. cit.), sino que están activos desde los primeros estadios del desarrollo de la hoja. Encuentra, además, significativas diferencias entre la flora de la cara adaxial y abaxial.

Taligoala (1969) y Pugh & Mulder (1971) estudiaron la incidencia de las condiciones acuáticas y semiacuáticas del hospedante sobre la micoflora. Analizaron el filoplano de Phragmites communis y Thypha latifolia, respectivamente. La sucesión es semejante a la de plantas no acuáticas, pero con predominio, en los primeros estadios, de las bacterias sobre los hongos. Los estados finales de la degradación

difieren, ya que hay mayor abundancia de hongos predadores, que reemplazan a los típicos del suelo.

Preece & Dickinson (1971) editaron los trabajos presentados en el primer simposio sobre ecología de los microorganismos sobre la superficie de las hojas, realizado en Inglaterra en 1970. En dicho simposio, Leben (1971) presentó una recopilación de las investigaciones sobre la microflora epifita sobre yemas. Introduce el término "gemisfera", para señalar la superficie de las yemas como un habitat particular. Los datos sobre el tema son hasta ese momento fragmentarios. Los organismos con mayores frecuencias son las bacterias y levaduras, los hongos filamentosos aparecen en bajo número. Entre los más frecuentes encontramos, como en la superficie de las hojas, a Cladosporium spp., A. pullulana y E. purpurascens (Hishop & Cox, 1969). Los modelos presentados por Lange & Leben (1970, 1971) y Leben y colaboradores (1968, 1970), indican que la yema sana y activa de algunas plantas anuales, pueden ser el sitio primario para el crecimiento de bacterias patógenas y no patógenas. Sugieren que estos organismos crecen profusamente cuando crece la hoja.

Pugh & Buckley (1971 a), Buckley & Pugh (1971) y Pugh (1974), estudiaron la microflora sobre hojas de Acer pseudoplatanus, desde los primeros estadios en el árbol hasta su descomposición completa en el suelo. El uso simultáneo de técnicas, entre las que se cuentan la de observación directa con MEB y la siembra de nervaduras previamente extraídas con pectinasas, les permitió observar un crecimiento fúngico activo desde que la hoja comienza a desarrollarse. Observaron que la distribución de Sporobolomyces sp. y A. pullulana, es a lo largo de las nervaduras principales, corroborando los hallazgos de otros investigadores (Ruinen, 1961; Pesante, 1963; Dickinson, 1967). Los colonizadores primarios comprenden a los enumerados por Hogg & Hudson (1966).

En su estudio de la microflora de pasturas en Nueva Zelanda, di Menna (1971) encontró que la mayoría de los hongos aislados pertenecen a grupos con capacidad para invadir tejido vivo, y señala

que "deben ser estudiados como organismos viviendo tanto en como sobre la hoja, y no como miembros del filoplano en sentido estricto". Agrega que " las levaduras, en cambio, no pertenecen a grupos con patogenicidad conocida, por lo tanto, se trataría de verdaderos organismos del filoplano".

La influencia de la microflora de la semilla sobre las partes aéreas de la planta, ha sido poco estudiada. Pugh & Buckley (1971 b) demostraron que A. pullulans puede ser aislado de la superficie previamente esterilizada de semillas de Acer pseudoplatanus. También fue aislado de yemas recién abiertas, lo cual indicaría un posible camino de colonización de las hojas desarrolladas (Pugh, 1974).

Godfrey (1974) estudió la microflora del helecho Pteridium aquilinum, que resultó similar a la encontrada en angiospermas de regiones templadas. Frankland (1966, 1969) estudió la descomposición del mismo helecho, y propone un patrón de sucesión (Frankland, 1974) semejante al de Garrett (1963) y Meredith (1960).

Sharma & Mukerji (1973, 1974) y Sharma (1974) describieron la microflora de hojas de Sesamum orientale y Gossypium hirsutum. Proponen la clasificación de la microflora en cuatro grupos, basados en el crecimiento sobre las hojas verdes y su participación en la descomposición (Sharma & Mukerji, 1976), (figura I c).

Lindsey & Pugh (1976) analizaron la microflora de Hippophæa rhamnoides, una planta que crece en dunas cercanas al mar. La sucesión resultó ser similar a la encontrada sobre otras gimnospermas.

Dickinson (1976) propuso un esquema de clasificación de los hongos epifilos (figura I d), en donde extiende la clasificación simple en residentes y casuales de Leben (1965), e incorpora el concepto de "especies transitorias y habitantes casuales", como los usan Lamb & Brown (1970) y Dickinson (1967), respectivamente. Utiliza para ellos el término "exótonos" usado por Park (1957), para señalar a los organismos que están mal adaptados a un determinado habitat y son incapaces de mantener un crecimiento activo. También incluye a los organismos que actúan en los primeros estadios de la descomposición (Hud-

son, 1968), enfatizando la necesidad de estudios conjuntos de estos dos aspectos de la colonización sobre la planta. Los patógenos se encuentran también representados en este esquema debido a que en muchos casos son componentes importantes de las poblaciones superficiales, y en otros es difícil decidir si una cepa aislada es patógena o no sobre un determinado hospedante.

Las algas comprenden el grupo de organismos epífilos menos estudiados. Allen (1973) analizó el patrón de distribución de Phycopeltis expansa sobre hojas de una orquídea tropical. Observó una correlación positiva entre la aparición del alga y la profundidad de las depresiones entre las células epidérmicas. El mismo patrón fue observado por Bernatein et al. (1973) y Bernatein & Carroll (1977) en la distribución de Protococcus sp. Estos autores utilizaron como técnica de observación directa la fluorescencia de los organismos epífilos. Describen, por medio de esta técnica, el patrón de colonización y la cobertura de las algas, actinomicetes y hongos filamentosos sobre hojas de Pseudotsuga menziesii. Compararon los resultados con observaciones efectuadas con el MEB. Señalando que éste último método proporciona mayor información sobre la topografía de la hoja, mientras la fluorescencia da mejores resultados en la identificación de los organismos. Desde los primeros trabajos de Barnes (1968) y Leben (1969), el MEB ha sido utilizado por numerosos investigadores en el estudio de la ecología de los organismos del filoplano (Davenport, 1970; Kilbertus, 1970; Beech & Davenport, 1971; Campbell, 1972; Gesner, 1972; Belin & Henry, 1973; Gourbier, 1974, 1975; Baker et al., 1979). Sin embargo, Diem (1973) indica que estas observaciones no han aportado mayor información que la suministrada por el microscopio óptico. Royle & Thomas (1971) recalcaron la importancia del uso del MEB en los estudios cuantitativos de la distribución microbiana sobre la hoja. Royle (1976) realizó una importante revisión sobre el tema y señaló los tópicos que pueden ser estudiados por este medio.

El conjunto de técnicas con que han sido estudiados los organismos del filoplano, caen dentro de dos grupos: aquellas en donde los organismos se observan directamente sobre la superficie de la hoja,

y en las que se los hace crecer sobre medios de cultivo apropiados (Lindsey, 1976).

En términos generales se observa un incremento en el número de técnicas utilizadas simultáneamente en cada estudio, desde los primeros trabajos hasta el presente. El progreso en el estudio de los microorganismos del filoplano depende del uso adecuado de una combinación de técnicas de observación directa y de cultivo (Dickinson, 1971). En el conjunto de técnicas empleadas hasta el presente, el parámetro más empleado para estimar las poblaciones ha sido la frecuencia. Otros parámetros, como la densidad, cobertura o biomasa, son difíciles de estimar, debido a las características del grupo de organismos involucrados. La densidad de las poblaciones de Sporobolomycetaceae, por ejemplo, medida por la técnica de caída de esporas, ha sido desestimada por Pennycook & Newhook (1978), debido a que el número de basidiosporas descargadas no es proporcional a la población.

La réplica de la superficie de la hoja ha permitido la estimación de la densidad de micelio y/o esporas (Dickinson, 1967; Stedelman, 1976; Bernstein & Carroll, 1977; Mc Bride & Hopes, 1977; Wildman & Parkinson, 1979; Breeze & Dix, 1981). Carroll et al., (1980) calcularon la biomasa de micelio, levaduras y algas epifílicas, en la superficie de ramitas de Pseudotsuga menziesii.

Uno de los aspectos de estos estudios que han merecido sólo en los últimos años el interés de los investigadores, es el uso de "tests" para analizar los datos obtenidos por las diferentes técnicas. En 1979, Wildman & Parkinson utilizaron el análisis de varianza (ANOVA) para estudiar la influencia que tiene la altura de las hojas en el árbol y, las estaciones del año, en tres campos diferentes de Populus tremuloidea. Los datos analizados se obtuvieron por medio de la técnica de lavado de hojas y esterilización superficial. Usaron, además, "tests" no paramétricos para analizar los resultados del número de esporas y longitud de micelio, obtenidos por réplica de la superficie de las hojas. Baker et al. estudiaron el número de especies fúngicas por medio del índice de similitud de Sorensen (1948) y por el méto-

FIGURA I

ESQUEMAS DE CLASIFICACION USADOS EN EL ESTUDIO DE LOS HONGOS DEL FILOPLANO

a- Clasificación en función de su actividad, según Leben (1965)

Colonizadores casuales (Kerling, 1964): organismos que son depositados en forma de esporas sobre la planta, pero que son incapaces de germinar y colonizar ese ambiente.

Residentes (Leben, 1961): miembros de la microflora que son capaces de crecer sobre la superficie aérea de las plantas.

b- Clasificación en función de la parte del ciclo de vida que cumplan sobre este habitat, según Dickinson (1965)Transitorios

organismos que se encuentran en estado de propágulos. Incluye también a las levaduras, las cuales pueden crecer activamente sobre la superficie de la hoja. Este grupo se pone de manifiesto con la siembra de alícuotas de agua de lavado de hojas, y no aparecen en los discos levados superficialmente. Ej. Mortierella alpina, Mucor hiemalis, Rhyarobius crustaceus, Aspergillus fumigatus, Botrytis cinerea, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Penicillium spp.

Crece y esporulan

se aislan por medio de los dos métodos: siembra de alícuotas de agua de lavado de hojas y, siembra de trozos lavados superficialmente. Ej. Cladosporium herbarum, Alternaria alternata, Dendryphiella salina.

FIGURA I (cont.)

Crecen solo vegetativamente

se aíslan de los trozos lavados superficialmente. Fructifican en las hojas moribundas o muertas, y en el suelo. Ej. Ascochyta abionis.

c- Clasificación en función de su crecimiento sobre las hojas verdes y su participación en la descomposición (Sharma y Mukerji, 1976)

- Grupo I : hongos que son poco activos y no participan en la descomposición.
- Grupo II : hongos que no se multiplican sobre las hojas verdes, pero que son causantes de la descomposición cuando la hoja envejece.
- Grupo III : hongos que se multiplican sobre las hojas verdes y tienen un importante papel en la descomposición.
- Grupo IV : hongos que no crecen sobre las hojas vivas, pero que aparecen en cámara húmeda.

d- Clasificación de los hongos epifilos según Dickinson (1976)

No patógenos

a. Habitantes del filoplano

incluye las especies que están mejor adaptadas para vivir sobre las hojas verdes. Son capaces de completar su ciclo de vida, o una parte significativa del él sobre la hoja viva. Se espera que no estén comprometidos en un proceso extensivo de descomposición. Ej. Sporobolomyces, A. pullulans, Cladosporium spp., fumaginae, especies de Chaetothyriaceae.

FIGURA I (cont.)

Se pueden distinguir tres categorías:

1. hongos que crecen continuamente
2. hongos con estructuras vegetativas tales, que les permiten alternar períodos de crecimiento y supervivencia.
3. hongos que cuando las condiciones son propicias completan rápidamente su ciclo de vida sobre la hoja. Tienen una eficiente dispersión de esporas y vuelven a crecer cuando se reanudan las condiciones favorables.

b. Invasores del filoplano

incluye las especies que pueden crecer extensivamente sólo cuando las condiciones son particularmente favorables. Ej. Alternaria sp., E. purpureascens, Stemphylium sp.

c. Saprófitos primarios

son incapaces de crecer en forma extensiva hasta la senescencia. Ej. Ascochyta sp., Leptosphaeria sp., Pleospora sp., Phoma sp.

Patógenos

- a. restringidos al filoplano. Ej. Erysiphe sp.
- b. que crecen en forma extensiva o sobreviven por largos períodos sobre el filoplano antes de la penetración. Ej. Alternaria sp., Botrytis sp., Drechslera sp., Septoria sp.
- c. que son incapaces de infectar a los hospedantes sobre los cuales se han depositado las esporas. Pueden tener crecimiento limitado o permanecer en dormición.

Exotonos (Park, 1957)

- a. hongos para los cuales el filoplano constituye un eslabón esencial en el ciclo de vida, el cual se completa principalmente en otro lugar. Ej. Cryptococcus, Myrothecium, Pilobolus.
- b. hongos depositados sobre las hojas, pero que son incapaces de sacar ventaja de ese habitat. Ej. Ganoderma, patógenos como en c., hongos del suelo.

do de Bray & Curtiss (1957). Andrews et al. (1980) usaron el ANOVA en el análisis de los factores que pueden modificar la microflora en árboles de grandes dimensiones.

1.2. Nutrición

Desde los primeros trabajos sobre los eprófitos del filoplano los investigadores mostraron interés en averiguar cuál era la fuente nutricional de los microorganismos. Brown (1922) demostró que los materiales presentes sobre la superficie de las plantas, favorecen la germinación de las esporas de hongos. Correlacionó el incremento de la conductividad eléctrica de las gotas de agua sobre las hojas de Cereus spectabilis con el incremento de la germinación de conidios de Botrytis cinerea. En Vicia fava, sin embargo, no tienen ningún efecto. En contraste con estos experimentos, los conidios de B. cinerea fueron estimulados por concentraciones bajas de "exudados" de V. fava, mientras que las concentraciones altas los inhibían (Kovacs & Szeoke, 1956).

Derx (1930) consideró que las Sporobolomycetaceae usan como nutrientes los azúcares "exudados" a la superficie de las hojas. Mes (1954) demostró que, al menos algunos de los materiales encontrados sobre las hojas, son "exudados" por la planta, bajo la influencia de la lluvia. Ruinen (1961) y Last & Deighton (1965), reconocen que los lixiviados ("leaching") de la superficie de las hojas, son la fuente nutricional de los organismos del filoplano. El "leaching" o lixiviación es un proceso pasivo difusional. Los iones provienen de los espacios de la pared celular de la hoja, y no de los espacios "internos" de las células del mesófilo. Estas células están bañadas por una solución de sales en la misma forma que las células corticales de la raíz. Dicha solución se encuentra en lo que se denomina el "espacio externo". Llena los espacios de la pared celular y forma una delgada capa que reviste los espacios intercelulares. Pero mientras la solución en el "espacio externo" de la raíz esté en rápida comunicación

por difusión con la solución del suelo, en el "espacio externo" de la hoja, limite con el aire. En tal situación, los iones de esta solución están obligados a pasar a la célula viva, y no a una pérdida por difusión como en la raíz. Sin embargo, esta situación se revierte cuando llueve, hay rocío o niebla. La solución del "espacio externo" se encuentra entonces en comunicación con una fina película de agua depositada sobre la hoja. En las lluvias intensas esa película se encuentra en constante renovación. Esa comunicación puede no ser tan grande debido a la acción que ejerce la cutícula y la excreción de ceras superficiales. Sin embargo, la cutícula no es enteramente impermeable, y está provista de ectodermos. Como resultado, los iones pueden lixiviar hacia la superficie de las hojas (Franke, 1967; Epstein, 1972).

Los lixiviados de las plantas incluyen una gran variedad de materiales. Se encuentran entre ellos todos los minerales esenciales incluyendo los macro y micro elementos. También se han encontrado azúcares, sustancias pécticas, aminoácidos y ácidos orgánicos. En proporciones menores, fueron identificadas sustancias como las giberellinas, vitaminas, alcaloides y sustancias fenólicas. Los lixiviados en mayor proporción son el K, Ca, Mg, Mn y los carbohidratos (Tukey, 1971). Las experiencias de Tukey y sus colaboradores indican que la cantidad de materiales que pasan de la hoja a la capa delgada de humedad es generalmente más grande en: i) las plantas deficientes que en las normales; ii) las plantas dañadas mecánicamente por heledas, que en las no dañadas (Tukey y Morgan, 1963); iii) las hojas mantenidas en la oscuridad que las que están a la luz (Tukey et al., 1957); iv) las hojas maduras que en las jóvenes, con un pico en la senescencia (Tukey et al., 1958).

La gutación es otra de las formas en que una cantidad sustancial de azúcares y aminoácidos se suma a los materiales de la superficie de las hojas.

En contraste con experiencias anteriores, Godfrey (1974), encontró que los lixiviados de hojas de helecho no afectan el porcentaje

de germinación de conidios de B. cinerea, aunque estimula la producción de tubos germinativos más grandes.

Muchos colonizadores de las hojas pueden obtener nutrientes adicionales de los detritus atrapados en la trama superficial de las hojas (Last & Deighton, 1965; Last & Warren, 1972; Dickinson, 1976). Ciertos organismos como Candida sp., Torulopsis sp., Sporobolomyces sp. y las Capnodiaceae, probablemente usen para su nutrición, las secreciones de ciertos insectos como los áfidos (Last & Deighton, 1965; Dickinson, 1976).

Fokkema (1968, 1971), Diem (1970, 1973, 1974), Norce (1972), comprobaron que en ausencia de nutrientes suplementarios, las poblaciones microbianas se ven estimuladas por los granos de polen depositados sobre la hoja. La base nutricional en este caso la constituyen las sustancias liberadas al medio por los granos de polen. A todo este cúmulo de nutrientes puede añadirse los provenientes de excreciones o muerte de otros organismos en la superficie de la hoja (Last & Warren, 1972).

1.3. Factores que controlan la comunidad

1.3.1. El hospedante y su ubicación geográfica

Los colonizadores más frecuentes del filoplano son de distribución cosmopolita, y no se ven afectados significativamente por la especie del hospedante (Last & Deighton, 1965; di Menna, 1971; Ruscoe, 1971). Voznayakovskaya & Khudyakov (1960) estudiaron la microflora de 18 plantas en Rusia, y no encontraron adaptaciones de las especies epifitas. Por otra parte Diem (1967), Dickinson (1973), Dickinson & Wallace (1976) y Tewari (1973), describen los hongos sobre hojas de trigo y cebada en Inglaterra, Francia e India, y encuentran que en las tres regiones la flora de ambas plantas estuvo dominada por Cladosporium sp. y Alternaria sp.

En un intento por comprobar el endemismo en hongos del filoplano, Beker et al. (1979), investigaron la micoflora de tres plantas endémicas de Hawaii. Encontraron que ésta no varía cualitativamente de la registrada en plantas de regiones templadas. Sin embargo, Ruinen, (1956) observó que las especies de Beijerinckia, que son muy comunes en el filoplano de los trópicos húmedos, no se encuentran en el follejo de otras regiones del mundo.

Krowlik et al. (1955) y Stout (1960) señalaron que la proporción relativa de bacterias difiere en relación con el hospedante. Mientras Flavobacterium spp. son predominantes sobre especies de Festuca y Poa, sus frecuencias son semejantes a las de Chromobacterium spp. y Pseudomonas spp. sobre Lolium. Del mismo modo las colonias de Beijerinckia sp. fueron más numerosas que las de Azotobacter sp. sobre hojas de Cacao y, en forma inversa, sobre citrus (Ruinen, 1961). Cuando la misma autora estudia las levaduras del filoplano de árboles y arbustos de Indonesia, observa la total ausencia de Torulopsis aëria y T. ingeniosa, dos especies muy frecuentes en el filoplano de plantas de Nueva Zelandia (Ruiner, 1963). Kerling (1964) encuentra que mientras Alternaria sp. y Cladosporium sp. son los géneros más abundantes en centeno, en el filoplano de frutilla son reemplazados por Botrytis sp.

Dickinson (1965) destacó la ausencia de Sporobolomyces roseus y la baja frecuencia de A. pullulans en hojas de Halimione portulacoides. Ambos organismos son considerados como los más frecuentes en una extensa variedad de plantas de diferentes latitudes (Last, 1955, 1970; Ruscoe, 1971; Pady, 1974; Dickinson & Wallace, 1976).

Hudson (1962), Lal & Yadav (1964) y Hudson (1968, 1971) observaron que en los trópicos las especies de Alternaria son reemplazadas, generalmente, por Nigrospora sphaerica y Curvularia lunata. Apinis et al. (1972) observaron que mientras en una localidad Polyactalum sp. es muy frecuente sobre hojas de Phragmites sp., en otras estaba ausente. Hudson (1962) y más tarde Dickinson (1967) postularon que las hojas de las plantas están colonizadas por dos grupos de hongos.

Uno formado por especies ubicuas y cosmopolitas, entre las que señala a Cladosporium spp., Alternaria spp., Botrytis spp., A. pullulans y E. purpurascens. El otro, formado por ciertas especies que denomina "elemento único", cuya distribución está restringida a un número limitado de hospedantes, por ejemplo: Metasphaeria en Carex, Fusicoccum en Pinus, Ascochyta en Halimione y Ascochyta pinodes en Pisum. Bell (1974) señaló que los organismos que se encuentran asociados a determinadas especies vegetales, tienen generalmente una fase parásita en el material vivo, y un estado saprofítico persistente en el material muerto.

La especificidad de ciertos organismos del filoplano, parece estar controlada por la naturaleza física de la superficie y, por la naturaleza química de los lixiviados de la hoja (Sinha, 1971). La superficie de las hojas puede presentar diferencias importantes en cuanto a las características de la venación, superficie de las células epidérmicas, cutícula, tricomas y ceras superficiales (Hallam & Juniper, 1971). Las hojas que presentan una topografía más irregular, tienen mayor proporción de organismos en el filoplano (Dickinson, 1971; Baker et al., 1979). Las nervaduras prominentes, la irregularidad de la cutícula, la profundidad de los espacios intercelulares y, la mayor densidad de tricomas y ceras superficiales, "proteje" a los propágulos y estructuras vegetativas de los factores climáticos. También modifican la persistencia del agua superficial y su acción en el movimiento de los solutos (Last & Warren, 1972).

La posición de la hoja sobre la planta es otro de los factores que puede influir sobre las características de la microflora en plantas diferentes. Las hojas pueden ser planas, o tener una posición vertical. La incidencia de los factores climáticos varía en una u otra. La radiación que recibe una hoja plana es dos o tres veces superior a la que recibe una hoja en posición vertical. Ciertos organismos pueden soportar estas radiaciones, mientras que otros son susceptibles a ellas. En las hojas planas, la cara abaxial es generalmente la que tiene mayor número de irregularidades en su topografía, y ma-

por número de estomas, lo que aumenta la humedad de esa superficie. Su posición brinda, además, protección contra el arrastre de esporas, micelio y nutrientes por las lluvias. Estas características hacen que generalmente dicha cara presente mayor densidad de organismos (Pugh & Buckley, 1971 a; Breeze y Dix, 1981).

Los lixiviados de la hoja representan la principal fuente de nutrientes de los organismos del filoplano. Tukey (1971) demostró que existen diferencias significativas en cuanto a volumen, época del año, y composición de estos lixiviados, en diferentes especies vegetales, y aún dentro de una misma especie, si existen variaciones en el clima o suelo en que crecen. Esta puede ser otra causa de la especificidad de ciertas especies del filoplano. Woller (1929), Khudyakov (1961) y Last & Deighton (1965), sugieren que las bacterias y hongos levaduriformes, son capaces de crecer sobre un amplio rango de hospedantes debido a que no requieren micronutrientes específicos para su crecimiento.

1.3.2. Edad y estado fisiológico de la hoja

La mayoría de los estudios del filoplano han sido realizados en plantas anuales o deciduas, y si perennes, con hojas de vida media corta. De tal manera que, la influencia de la edad de la hoja en la comunidad del filoplano, se confunde con los efectos producidos por los factores climáticos en el transcurso de las estaciones del año. No obstante, desde los primeros trabajos se ha sugerido que las especies fúngicas "aparentemente cambian con la edad de la hoja" (Potter, 1910).

Last (1955) observó cambios cuantitativos en la población de Sporobolomyces roseus sobre hojas de centeno. La frecuencia de esta especie fue mínima hasta la mitad de la vida media de la hoja, en que aumenta hasta un máximo después que la hoja muere. Del mismo modo, Ruinen (1956, 1971) indicó que "las poblaciones fúngicas están prác-

ticamente ausentes en las hojas jóvenes, el incremento comienza cuando la hoja madura, pudiendo alcanzar considerables dimensiones en las hojas viejas." "Las poblaciones bacterianas se comportan de la misma manera". Webster (1956, 1957) observó cambios cualitativos graduales de la flora fúngica en hojas de Dactylis glomerata. Describió un patrón de colonización en función del estado fisiológico de la hoja, desde la senescencia hasta la muerte de la planta (figura II a). En Saccharum officinarum, Hudson (1962) reconoció tres grupos sucesivos que se reemplazan con períodos de dos meses (figura II b). Hogg y Hudson (1966) obtienen resultados similares en hojas vivas y muertas de Fagus sylvatica (figura II c).

Dickinson (1967) señaló que las hojas jóvenes parecen estar libres de micelio; en las hojas activas de cualquier edad el número de especies es bajo, aumentando considerablemente con la senescencia. Sin embargo, Ruscoe (1971), demostró que los hongos filamentosos son activos desde los primeros estadios del desarrollo de las hojas de Nothofagus truncata. A. pullulans fue uno de los primeros colonizadores de esta planta, y su frecuencia aumentó con la edad de la hoja, disminuyendo cuando ésta cae al suelo.

Pugh & Buckley (1971 a), Buckley & Pugh (1971) y Pugh (1974) proponen una sucesión fúngica en Acer pseudoplatanus. Por tratarse de un árbol caducifolio, sus resultados están influenciados por los efectos del cambio de estación (figura II d). En el primer grupo, formado por los primeros colonizadores, distinguen una sucesión interna, probablemente controlada por competencia interespecífica. El segundo grupo, está formado por especies que colonizan el sustrato en la senescencia. En el tercero se agrupan las especies que aparecen cuando las hojas caen al suelo.

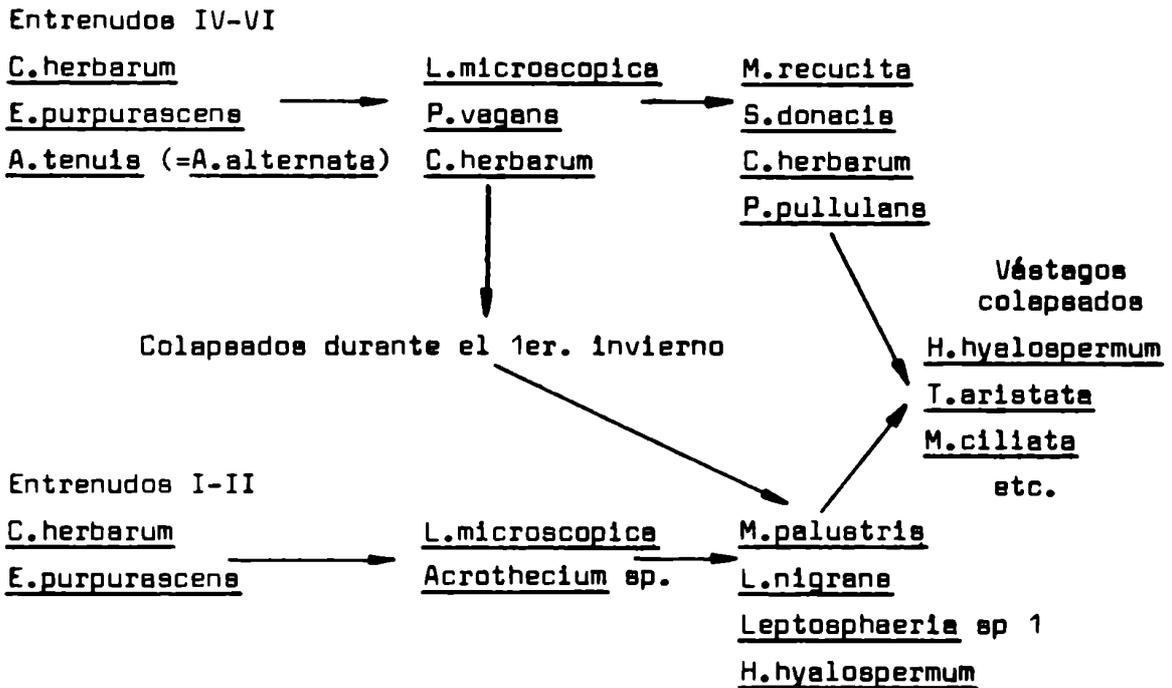
El número de esporas y la densidad de micelio también aumentan con la edad de la hoja (Wildman & Parkinson, 1979). Mishra & Dickinson (1981) estudiaron los cambios de la micoflora en hojas de vida larga (5-8 años) de Ilex aquifolia. La vida prolongada de las hojas, y el muestreo adecuado, les permitió separar la influencia de las estaciones, de la edad de la hoja. Ningún taxon tuvo preferencia por un

tipo de hoja en particular. Sin embargo, observaron un aumento cuantitativo de las poblaciones con la madurez y senescencia. Estos resultados demuestran que las hojas de clima templado no desarrollan una flora tan compleja y extensa como lo postuló Ruinen (1961) para hojas de plantas tropicales. Por otra parte, Dickinson (1965) no observó variaciones significativas de la frecuencia de ciertas especies (C. herbarum, A. pullulans, Ascochyta sp.) en hojas jóvenes y senescentes de Halimione portulacoides. Sin embargo otras, como Cephalosporium sp., aumentan su frecuencia en las hojas senescentes, y Fusarium culmorum y Pleospora vagans, en las muertas. El aumento de las poblaciones con la edad de la hoja, probablemente esté reflejando cambios en el tipo y cantidad de nutrientes lixiviados por el hospedante en los diferentes estadios (Laet & Deighton, 1965). Ruinen (1961) señaló que los lixiviados decrecen con la edad de la hoja, y por esa causa se produce un "climax" de la comunidad, en la hoja madura. Cuando sobreviene la senescencia y se reducen los lixiviados, los requerimientos nutricionales pueden ser provistos por otros organismos. La colonización de las levaduras, por ejemplo, puede depender de la actividad bacteriana anterior, durante la cual se liberan elementos nutritivos. Las experiencias de Tukey y sus colaboradores, demuestran que los lixiviados aumentan con la edad de la hoja hasta un máximo, que se produce cerca de la senescencia (Tukey, 1971). En las hojas en que disminuye la lixiviación, los microorganismos pueden continuar desarrollándose por el aporte de nutrientes suministrado por hojas más activas a un nivel más alto sobre la planta. El movimiento de los nutrientes se realizaría por medio de las lluvias (Ruinen, 1971). Además, no debe ignorarse la posibilidad de que la secuencia de la colonización saprófita sobre las hojas esté controlada, en parte, por la producción de fitoalexinas en la planta. Las hojas al envejecer pierden gradualmente la capacidad para producir estas sustancias, lo que explicaría el aumento cuali y cuantitativo de la microflora (Laet & Warren, 1972).

FIGURA II

PATRONES DE COLONIZACION FUNGICA

a- Patrón de colonización fúngica de tejido moribundo, y muerto sobre la planta, en Dactylis glomerata (Webster, 1956, 1957)



b- Patrón de colonización fúngica de tejido senescente y muerto sobre la planta, en Saccharum officinarum (Hudson, 1962)

Grupo I

Primeros colonizadores (saprófitos primarios)

Leptosphaeria sacchari, Guignardia citricarpa, Cladosporium herbarum, Nigrospora sphaerica, Alternaria alternata, Curvularia lunata, Helminthosporium sacchari, Pleocyta sacchari, Glomerella tucumanensis, Collatotrichum falcatum, Leptosphaeria michotii

FIGURA II (cont.)

Grupo II (aparecen 2-3 meses mas tarde)

Periconiella echinoclaoe, Lacellinopsis sacchari, Pithomyces maydicus, Leptosphaeria eustomoides, Ascochyta sp., Papularia vinosa, Melanconium sp.

Grupo III (aparecen 2-3 meses mas tarde que el grupo II)

Lacellina graminicola, Spegazzinia tessartha, Anthostomella tomicum, Anthostomella minima, Lophodermium arundinaceum, Tetraploa aristata, Didymosphaeria sp., Apiospora camptospora, Metasphaeria sp., Pleospora vagans

c- Patrón de colonización fúngica en hojas vivas y muertas de Fagus sylvatica (Hogg y Hudson, 1966)

Grupo I (hongos en las hojas sobre el árbol que persisten un tiempo después que la hoja cae al suelo)

Diacula quercina, estado conidial de Gnomonia errabunda, Cladosporium herbarum, A. pullulans, A. alternata, Botrytis cinerea

Grupo II (hongos que aparecen cuando la hoja está en el suelo)

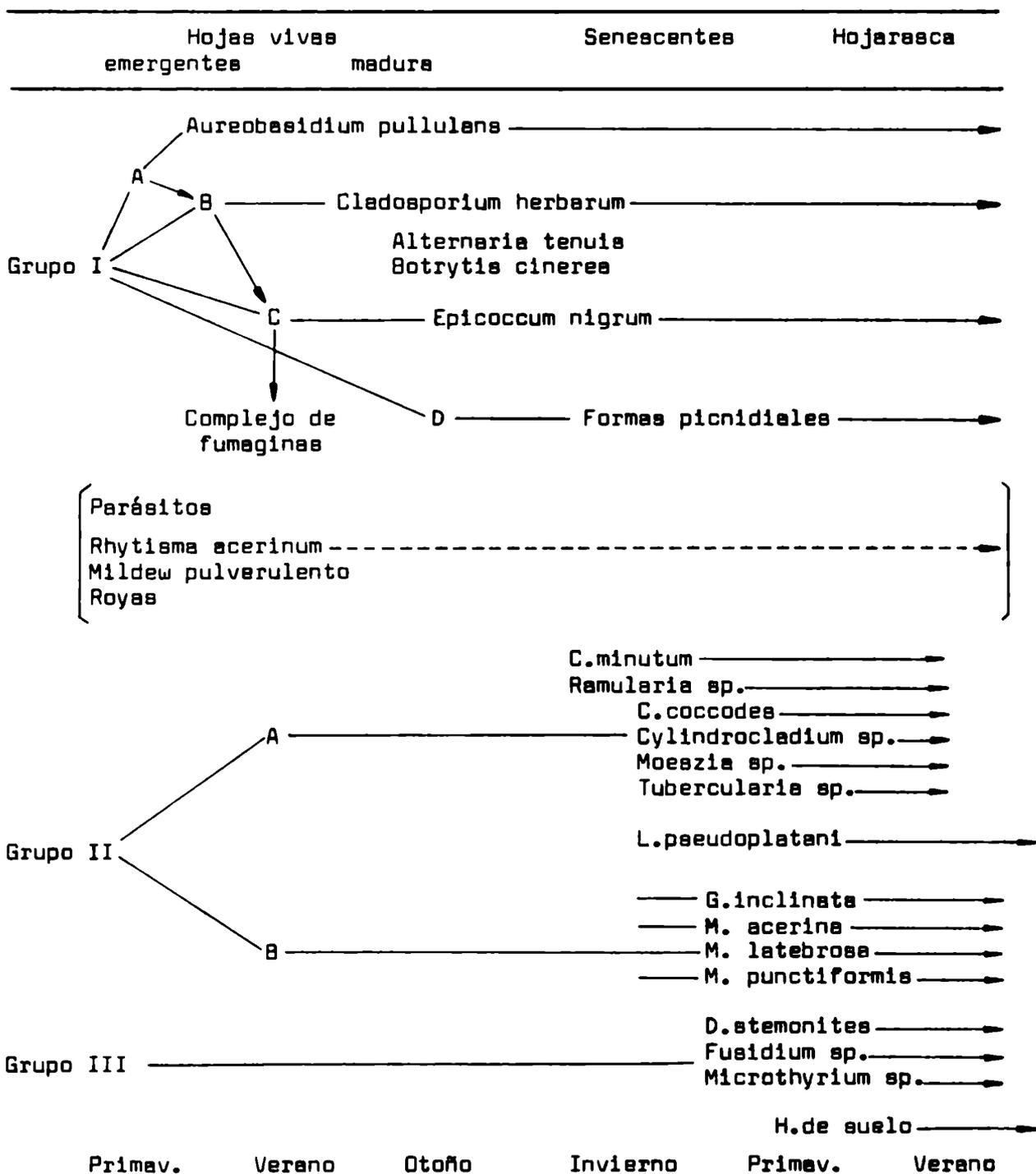
Discosia artocreas, Gnomonia errabunda, Mollisia acerina, Mycosphaerella punctiformis, Guignardia fagi, Mycosphaerella tassiana

Grupo III (último grupo de hongos que aparece)

Polyscytalum fecundissimum, Spondylocladiopsis cupulicola, Microthyrium microscopium, Mollisia sp., Lachnella villosa, Helotium caudatum, Endophragma stemphylioides, E. catenulata, E. elliptica, E. laxa, Pistillaria pusilla, Chalara cylindrosperma, Doratomyces stemonitis

FIGURA II (cont.)

c- Patrón de colonización fúngica en hojas de *Acer pseudoplatanus* (Pugh, 1974)



1.3.3. Estaciones del año

Por las causas detalladas en el punto anterior, los resultados de numerosas investigaciones se confunden con las variaciones debidas a la edad y estado fisiológico de la hoja. No obstante, parece existir una marcada estacionalidad en la flora del filoplano (Sinha, 1971; di Menna, 1971; Collins, 1976 ; Last & Warren, 1972; Latch & Mc Kenzie, 1977; Baker et al., 1979). En muchos casos estos cambios son más importantes que los atribuidos a la edad de la hoja (Gourbier, 1974, 1975; Mishra & Dickinson, 1981). Sin embargo, Meredith (1962) y Dickinson (1965) no observaron estacionalidad en la flora fúngica de Musa sp. y Halimione portulacoides, respectivamente. Estas variaciones parecen correlacionarse principalmente con dos factores meteorológicos: humedad y temperatura. Last (1955) señaló que la humedad atmosférica es uno de los factores que afecta con mayor intensidad la concentración de S. roseus sobre trigo y cebada. Sin embargo, la temperatura parece ser el factor más importante en la distribución estacional de la flora fúngica de Dactylis glomerata (Webster, 1956, 1957). Pugh (1958) observó que los organismos son más abundantes en verano que en invierno, y que estos aumentos parecen correlacionarse con la temperatura. Lamb & Brown (1970), Rucoe (1971) y Latch y Mc Kenzie (1977) también señalan un aumento de la comunidad fúngica del filoplano en verano. Di Menna (1959) observó que mientras Rhodotorula sp. aparece con mayor frecuencia en verano, Cryptococcus sp. lo hace en invierno.

Un análisis de la estructura de la comunidad fúngica sobre hojas de Acer platanoides, demuestra que existen numerosas fluctuaciones en la densidad de micelio y esporas germinadas durante gran parte del año, pero en otoño se establece una comunidad más grande y más estable (Breeze & Dix, 1981). Mishra & Dickinson (1981) observaron que los cambios en la micoflora son predominantemente cuantitativos. La densidad hifal sobre hojas de Ilex aquifolia es mayor en otoño y principios del invierno. Gourbier (1974, 1975) también observó un aumento de la micoflora en invierno. Las condiciones de humedad y tempe-

ratura hacen variar significativamente la frecuencia de los organismos aislados, pero aquellos que tienen condiciones para invadir tejido vivo estarían más capacitados para sobrevivir, y su frecuencia no variaría significativamente con los cambios climáticos (di Menna, 1971).

Otros factores que pueden ser la causa de las variaciones estacionales de la microflora son : la abundancia de esporas en la atmósfera (Gregory & Hirst, 1957), y la radiación UV (Krowlik et al., 1955).

1.3.4. Posición de la hoja sobre la planta

A pesar del número reducido de antecedentes sobre el tema, podemos afirmar presuntivamente, que la posición de la hoja tiene influencia significativa sobre la comunidad del filoplano. Webeter (1956, 1957) encontró variaciones cuali y cuantitativas entre los entrenudos superiores e inferiores de Dactylis glomerata. Wildman & Parkinson (1979) estudiaron la microflora de hoja ubicadas a tres alturas diferentes sobre el árbol, y observaron una declinación de la densidad fúngica con la altura, pero sólo en la cara adaxial de las hojas maduras. Cuando Andrews et al. (1960) compararon las influencias que tienen sobre la comunidad del filoplano la altura de la hoja en el árbol, y su orientación (N-S-E-O), y la proximidad de las hojas a la periferia de la copa, encontraron que los hongos filamentosos, bacterias y levaduras muestran una tendencia a disminuir con la altura. El número de bacterias es mayor en las hojas maduras del interior de la copa, pero en las hojas más viejas es menor. Los hongos y levaduras no presentan un patrón de distribución estable. La orientación de la hoja, en cambio, no parece tener efecto sobre la distribución de la microflora. Los datos fueron obtenidos sólo por medio de la técnica de siembra de agua de lavado de las hojas, de tal modo que reflejan preferentemente las variaciones de las especies casuales o transitorias. Los autores señalan que estas variaciones pueden ser atribuidas

a diferencias en el acceso que el inóculo proveniente de la atmósfera, tiene a la hoja. Se ha observado que la concentración de los organismos de la atmósfera es más alta cerca del suelo y que disminuye con la altura (Gregory, 1973). Las diferencias microclimáticas puede ser otra de las causas de variación. Las hojas del interior de la copa están más protegidas que las de la periferia, y las inferiores, más que las superiores.

1.3.5. Patógenos

La presencia de Sporobolomyces roseus parece no influir ni ser influenciada por el desarrollo de patógenos en las hojas (Last, 1955). Sin embargo, investigaciones posteriores indican que los patógenos foliares, especialmente las royas, alteran la composición de la comunidad fúngica del filoplano, principalmente las poblaciones de levaduras (Last, 1970; Pady, 1973, 1974; Mc Kenzie & Hudson, 1976). Brady (1960) demostró que las colonias de Itersonilia perplexans son más numerosas sobre Calendula officinalis infectada con Entyloma calendulae que sobre las hojas sanas. Al comparar la microflore epifila de hojas sanas e infectadas con Erysiphe graminis-hordei, Sharma & Garg (1979), observaron diferencias cualitativas y cuantitativas. Distinguen tres grupos de hongos que se comportan de forma diferente: i) indiferentes al estado de la hoja, es decir que tienen frecuencias semejantes en hojas sanas y enfermas; ii) hongos restringidos a hojas infectadas o a las no infectadas; y iii) hongos que tienen frecuencias más altas en alguno de los dos tipos de hojas. Un trabajo posterior de los mismos autores, confirma su hipótesis de que los dos tipos de hojas, representan nichos ecológicos diferentes (Garg & Sharma, 1980).

Las diferencias que se observan en la microflore epifila de hojas infectadas, pueden ser explicadas por variaciones en la composición química y por la naturaleza del complejo de nutrientes sobre la hoja. El incremento de la frecuencia de algunos hongos comunes del

filoplano, en hojas enfermas, puede reflejar una mayor disponibilidad de nutrientes, provenientes de las células muertas, y una mayor lixiviación en los tejidos enfermos (Last & Deighton, 1965).

1.4. El papel de los saprófitos sobre la planta

A pesar de que existen pocos trabajos experimentales dirigidos a demostrar el papel de estos organismos en el filoplano, en la mayoría de los estudios florísticos o ecológicos se ha especulado sobre su función en ese habitat.

Los investigadores sugieren que los saprófitos de las hojas pueden estar relacionados fundamentalmente con tres aspectos importantes: i) el control de las enfermedades, ii) la economía de los nutrientes, y iii) la degradación primaria de los restos vegetales. Ya Potter en 1910 se preguntaba si "las bacterias de la superficie de las hojas estarían involucradas en el sistema de inmunidad de la planta", y si "modificarían de alguna manera la vida de otras bacterias u hongos cuando se ponen en contacto". Crosse (1959) encontró que las bacterias saprófitas más comunes sobre hojas de cerezo, disminuyen la incidencia de la infección del parásito Pseudomonas morsprunorum. El equilibrio entre saprófitos y parásitos en las hojas puede mantenerse según su capacidad para competir por los nutrientes disponibles, o por antagonismo (di Menna, 1962). Last & Deighton (1965) señalaron que los saprófitos sobre las hojas podrían actuar disminuyendo la fuente de energía (aminoácidos y carbohidratos), los que de otro modo estimularían el crecimiento de los parásitos. Por otra parte, ciertos organismos podrían actuar en forma inversa. Smit & Weringa (1953) y Ruinen (1963) demostraron que A. pullulans y Cryptococcus sp. pueden descomponer pectinas y lípidos. Esta acción puede acrecentar la secreción de nutrientes por la planta, y de ese modo aumentar su disponibilidad para los parásitos.

Crosse (1965) dedujo de sus experiencias que el efecto de los

saprófitos es reducir la dosis eficaz del inóculo del patógeno, compitiendo con él en las primeras etapas del crecimiento intravascular, o bien segregando metabolitos que disminuyan la virulencia del patógeno o estimulen la resistencia del hospedante.

La competencia entre parásitos y saprobios puede estar controlada por la producción de antibióticos por parte de los saprobios (Last & Deighton, 1965). Además, se considera que éstos pueden afectar el desarrollo de los patógenos mediante la estimulación de la producción de fitoalexinas por el hospedante (Last & Warren, 1972). Aunque se conoce poco acerca de la traslocación de éstas sustancias, se las ha observado en gotas de la superficie foliar, donde actuarían impidiendo la germinación y por lo tanto el ataque de los patógenos.

Se observó que las lesiones causadas en las hojas por Alternaria zinnia se reducían al añadir a los inóculos blastosporas de A. pullulans (van den Heuvel, 1969). Sin embargo, Tsuneda & Skoropad (1978) al estudiar el ataque de A. brassicae y A. raphani en hojas de repollo, no pudieron comprobar ninguna acción de la flora epifila sobre éstos parásitos.

Ruinen (1965) demostró que algunos organismos del filoplano de plantas tropicales fijan el nitrógeno atmosférico. Numerosos autores han sugerido que si existe una cantidad suficiente de fijación y absorción, ello puede beneficiar el crecimiento de las plantas (Last & Deighton, 1965; Ruinen, 1965; Lamb & Brown, 1970). Se ha comprobado que ciertos hongos del filoplano pueden liberar giberelinas, y que bacterias, levaduras y hongos filamentosos o levaduriformes, pueden producir sustancias parecidas a las auxinas. Last & Warren (1972) sugieren que si estas sustancias promotoras del desarrollo son liberadas en cantidades suficientes, pueden influir en el crecimiento de las plantas.

La intervención de los saprófitos del filoplano en la degradación primaria de los restos vegetales es, quizás, la función mejor demostrada de estos organismos.

2. Los microorganismos endofilos

Los endofitos han sido considerados tradicionalmente como organismos patógenos. Sin embargo, las investigaciones de los últimos años han confirmado la existencia de endofitos que no producen signos externos de infección en la planta hospedante, y que denominamos endofitos no patógenos. En algunos casos, se trata de organismos inicialmente descritos como saprófitos de tejidos muertos de determinadas especies de vegetales superiores, en las que más tarde fueron registrados como endofitos. En otros casos fueron descritos sobre sustratos diferentes de las plantas que infectan, como estiércol o madera en descomposición. Ciertos endofitos aislados de una planta sana, son patógenos en otras especies vegetales y, a veces, en la misma planta estudiada. No obstante, la planta puede desarrollar normalmente su ciclo de vida sin mostrar signos de enfermedad. Luginbühl & Müller (1980) señalan que estos patógenos en plantas sanas pueden estar inhibidos como tales por dos factores: i) la competencia y efecto inhibitorio de otros organismos, y ii) el rechazo de la planta hospedante. Si cambian ciertas condiciones, y producen, por ejemplo, un debilitamiento del hospedante, aquellos organismos se vuelven patógenos.

Los hongos endofilos, organismos no patógenos de las hojas, han sido los más estudiados hasta el presente. Su existencia fue reconocida durante 60 años, pero hasta los trabajos de Carroll et al. (1977) y Bernstein & Carroll (1977) no despertaron el interés de los investigadores. Estos y posteriores estudios, demostraron que los endofitos no patógenos están distribuidos en los vegetales superiores, no sólo en las hojas sino en el interior de toda la planta.

Los primeros trabajos estuvieron orientados hacia el estudio de las infecciones latentes de organismos patógenos (Shear & Wood, 1913; Sampson, 1933; Tokunaga & Yokohama, 1955; Tokunaga & Ohira, 1973), pero al mismo tiempo se reconocieron organismos que no son causantes de enfermedad (Mc Lennan, 1920; Sampson, 1935, 1938, 1939). Este último autor registra la presencia de dos hongos filamentosos en

los tejidos de plantas sanas de Lolium spp. y otras gramíneas. La infección parece transmitirse tanto por la semilla como por propagación vegetativa. No se encontraron fructificaciones en los tejidos de la planta, y no pudieron identificarse en cultivo.

Bose (1947) encontró que todas las plantas de Casuarina equisetifolia que examinó, tenían en su interior micelio de Phomopsis casuarinae. Confirmó la transmisión de la infección por la semilla, ya que encontró micelio fúngico en las cubiertas seminales, aunque el embrión parecía no estar infectado.

La transmisión por medio de crecimiento miceliano fue corroborada por medio de experiencias con injertos (Schüepp, 1961; Bolay et al., 1968). Estudiando una enfermedad de los granos verdes de Coffea arabica producida por Colletotrichum coffearum, Rayner (1948) registra una infección latente de este hongo, y otros que no producen enfermedad, en hojas, granos verdes, pecíolos y ramitas sanas.

Boullard (1951) realizó observaciones de endofitos no patógenos en algunos helechos europeos. Los de hojas de tabaco fueron estudiados en primer lugar por Welty (1968) y más tarde por Norse (1971, 1972).

El uso de técnicas de esterilización superficial en los estudios del filoplano, dió un nuevo impulso al estudio de estos organismos (Kendrick & Burges, 1962; Last & Deighton, 1965; Ruscoe, 1971; Pugh & Buckley, 1971 a y b). Algunos de los más conocidos habitantes del filoplano fueron registrados también como endofilos (Pugh & Buckley, 1971 b; di Menna, 1971).

Entre los organismos registrados en este habitat, los Ascomycetes y Deuteromycetes muestran una excepcional abundancia, quizás porque se ha puesto en ellos la mayor atención. No obstante, también se han encontrado levaduras y bacterias (Davenport, 1970). La primera cita de un Basidiomycete como componente de la flora endofila fue dada por Petrini & Carroll (1981), quienes encontraron un taxon no descrito de las Corticiaceae en Thuja plicata. Citan una comunicación personal de E. Horak, B. Widley y T. Riese, sobre una especie no des-

cripta de Maresmius aislada de Trifolium spp. y Arctostaphylos uva-ursi. Hasta el presente los hongos inferiores no han sido registrados como endofilos no patógenos.

Aunque los endofilos fúngicos parecen estar ampliamente distribuidos, la mayoría no fructifica con frecuencia sobre los sustratos naturales, o producen cuerpos fructíferos inconspicuos. Como resultado, la mayoría de los aislamientos pertenecen a taxones que son poco frecuentes y, a menudo, aún no descriptos.

La presencia de estos organismos se registra generalmente por medio de técnicas de cultivo de tejidos con esterilización superficial previa. En menor grado se han utilizado técnicas de observación directa (Lewis, 1924; Sampson, 1933, 1935, 1938; Neill, 1940; Bose, 1947). Bernstein & Carroll (1977) confirman la presencia de endofilos usando el MEB. Bell (1974), señala la posibilidad de usar técnicas de inmunofluorescencia para la identificación del micelio en el interior de las hojas, como las usadas por Paton (1964) y Warnock & Preece (1971) para bacterias en tubérculos de papa y hongos filamentosos en granos de avena, respectivamente.

La dinámica de las poblaciones de endofilos comienza a ser estudiada tan sólo en los últimos diez años. Norse (1972) observó que la frecuencia de Colletotrichum cochlioides aumenta con la edad de la hoja. Esta característica de las poblaciones fúngicas de endofilos, es confirmada más tarde por numerosos investigadores (Carroll et al., 1977; Luginbühl & Müller, 1980; Bernstein & Carroll, 1977; Petrini & Müller, 1979; Petrini & Carroll, 1981). Este aumento podría estar indicando que la colonización se produce a partir de la caída de esporas. Así, las hojas expuestas durante más tiempo al inóculo de la atmósfera resultarían más infectadas (Carroll et al., 1977). A pesar de esta tendencia tan generalizada, en Thuja plicata se observó una disminución de la frecuencia de aislamiento en los tejidos más viejos (Petrini & Carroll, 1981). El mismo patrón fue registrado por Sherwood & Carroll (1974) en hojas de Pseudotsuga menziesii infectada con Schizothyrium pommi.

El grado de infección por endofilos disminuye con la altura sobre el nivel del mar y, aumenta con la humedad del sitio de muestreo. La precipitación como lluvia parece ser el factor más importante en este aumento de la frecuencia de infección, al incidir sobre la dispersión de los organismos (Carroll & Carroll, 1978). Corroborando estas observaciones, Petrini & Müller (1979) y Luginbühl & Müller (1980) señalan que la zona de muestreo es un determinante de la flora fúngica endofila. En su estudio de algunas Cupressaceae de Oregon, Petrini & Carroll (1981), demuestran que en todos los hospedantes estudiados, las muestras provenientes de "standes" homogéneas, con follaje cerrado, tienen mayor grado de infección que los de "standes" mixtos con follaje abierto. En el mismo trabajo señalan que el grado de infección se incrementa con la cercanía de la hoja al tronco. Estas variaciones parecen estar también correlacionadas positivamente con el aumento de humedad del microclima del "stand" o del follaje del árbol, y con la disponibilidad del inóculo atmosférico.

La distribución de los endofilos en las hojas no es homogénea, generalmente está concentrada en las nervaduras, especialmente en la nervadura central (Luginbühl & Müller (1980). Con pocas excepciones las especies fúngicas encontradas en el pecíolo, son diferentes a las de la lámina de la hoja. Algunos resultados sugieren que los hongos de la lámina son dependientes, sobre el hospedante, únicamente de la fuente de carbono, mientras que los del pecíolo son descomponedores más activos (Carroll et al., 1977; Bernstein & Carroll, 1977). Los hongos del pecíolo se encontraron también en las ramas. Experiencias de cultivo de ramitas dan como resultado que los hongos se encuentran en la corteza pero no en el sistema vascular (Carroll et al., 1977).

Los datos de distribución de los endofilos dentro de la hoja pueden proveer evidencias indirectas sobre el modo de infección. Si el mismo hongo se aisla de trozos no contiguos de la hoja estudiada, la infección probablemente se produce a través de esporas. Si los trozos infectados son contiguos y, la infección progresa con la edad de la hoja, desde el pecíolo hacia el ápice, la infección probablen-

te es sistémica. Los hongos asociados al pecíolo serían consecuentemente sistémicos, mientras que los de la lámina, infectarían la hoja por medio de esporas (Carroll et al., 1977).

Según Bernstein & Carroll (1977), la colonización interna podría producirse por los siguientes caminos: i) sistémica por pecíolos y ramitas, ii) penetración de micelio de hongos residentes en el filopiano, a través de la cutícula o estomas, iii) por acción de insectos succionadores, y,iiii) por esporas. Dichos autores señalan que a través de las experiencias realizadas hasta el momento, sólo puede demostrarse si los hongos endofilos son sistémicos o no, pero no puede probarse si la colonización se produce por alguna de las otras tres vías.

La zona proximal de la hoja presenta generalmente mayor frecuencia de endofilos que la zona distal (Bernstein & Carroll, 1977; Petriani & Müller, 1979; Luginbühl & Müller, 1980).

Bernstein & Carroll (1977) estudiaron los endofilos en hojas que se encontraban a diferentes alturas sobre el árbol, pero no encontraron diferencias significativas en el índice de infección.

Numerosos endofilos han demostrado tener especificidad por un hospedante o grupo afín (Carroll & Carroll, 1978; Luginbühl & Müller, 1980). Este grado de especificidad permite usar la flora interna de las hojas como una medida de afinidad taxonómica entre especies vasculares. Carroll & Carroll (1978) encontraron resultados positivos al comparar la flora endofila de cuatro especies de Abies. Señalan que esta comparación tiene resultados taxonómicos útiles cuando los endofilos son abundantes y están ampliamente distribuidos en las especies vasculares que se comparan.

Luginbühl & Müller (1980) clasifican a los endofilos fúngicos encontrados sobre Juniperus communis en tres grupos: i) hongos que se asientan casualmente. Se trataría de endofilos raros, de los cuales se sabe poco en cuanto a su relación con el hospedante. ii) hongos ubicuos, que están presentes en varias especies vasculares. iii) hongos específicos. A estos últimos, se los conoce en la literatura como patógenos, o como habitantes del tejido muerto de determinadas es-

pecies. Llama la atención el grupo ii, entre los que se registró a Sordaria fimicola, Chaetomium spp. y Nodulisporium spp., este último comprende anamorfos de diferentes Xylariaceae, en especial Xylaria spp. Las características endofilas de estos organismos sorprende, ya que se los conoce como especies comunes en estiércol o madera en descomposición. Señalan que debe aceptarse que se trata de organismos ampliamente distribuidos, cuyas fructificaciones aparecen únicamente sobre determinados sustratos.

Noree (1972) señaló que los endofilos de tabaco, permanecen en dormición en los tejidos, o establecen una relación de parasitismo latente de duración desconocida. La relación con el hospedante fue descrita por Bell (1974) como simbiótica, parásita o saprófita. De acuerdo con las definiciones de Cook (1977) se trataría de un tipo de simbiosis denominada mutualista o neutra (Carroll & Carroll, 1978; Luginbühl & Müller, 1980; Petrini & Carroll, 1981).

La colonización interna del tejido vivo por endofitos no patógenos, estaría limitada a las cavidades subestomáticas y a los espacios intercelulares, donde podrían obtener los nutrientes de las células que los rodean (Bell, 1974). Bernstein & Carroll (1977) observaron que el desarrollo de los endofilos de Pseudotsuga menziesii es siempre intercelular.

El papel que juegan estos organismos en los tejidos vegetales es difícil de demostrar. Carroll et al. (1977) indican que la presencia de endofilos no patógenos en las hojas vivas puede proteger a los hospedantes contra las infecciones de parásitos activos, mediante efectos de antagonismos; permitir la reabsorción de sustancias orgánicas y minerales de los lixiviados, y conducir a la distribución de los nutrientes antes de que la hoja caiga. Carroll & Carroll (1978) postulan que podrían disminuir la palatabilidad de los tejidos para los insectos fitófagos. Es indudable que la mayoría actúa como degradadores iniciales de los tejidos, antes de que éstos lleguen al suelo. Sin embargo, estas hipótesis esperan aún ser demostradas mediante experiencias directas.

3. Modelos de colonización

Los modelos de colonización de materia orgánica por microorganismos, propuestos hasta el presente, exceptuando el de Bell (1974), se refieren principalmente a los restos vegetales en descomposición sobre el suelo, y dan menor importancia a lo que sucede en la planta viva. Sin embargo, tales modelos son analizados aquí, debido a la estrecha relación que existe entre la colonización del sustrato vivo, y el senescente y muerto. Estos modelos van incorporando gradualmente el concepto de colonización del sustrato vivo por epífitos y endófitos, y constituyen el fundamento para adaptaciones o futuros modelos de colonización de la filosfera.

Garret (1963) propuso un modelo de colonización fúngica de sustratos vegetales en el suelo, que es la base de los modelos posteriores (figura III a). La sucesión propuesta está relacionada con la secuencia de utilización de los principales constituyentes orgánicos de la materia, estableciéndose un orden de progresiva complejidad en los componentes degradados. Cada etapa está caracterizada por la presencia de especies con capacidades metabólicas y competitivas particulares, que les permiten descomponer determinadas fracciones del sustrato. Consideró en este modelo únicamente los tejidos senescentes y muertos. En los primeros actuarían los parásitos débiles, y en los segundos los saprófitos primarios, que son los que utilizarían los carbohidratos simples y, eventualmente, celulosa y lignina.

El modelo propuesto por Hudson (1968) incorpora el sustrato vivo, pero concede poca importancia a los organismos de la filosfera. Considera a éstos con actividad únicamente a partir de la senescencia, cuando comenzarían a actuar como saprófitos primarios (figura III b). Los aspectos funcionales de la descomposición son los mismos propuestos por Garrett (1963).

Bell (1974) amplió los modelos anteriores, relacionando la actividad de la microflore durante la colonización. Incorporó los organismos del filoplano, y analizó los eventos que se suceden sobre la

planta hasta que los tejidos muertos caen al suelo (figura III c). Señaló que se descomponen más rápidamente las hojas que presentan mayor cantidad de organismos del filoplano. Observa que en la degradación actúan más los saprófitos primarios que los degradadores de celulosa y pectina.

Pugh (1980) explica los cambios que se observan a través del tiempo en la micoflora que coloniza cualquier tipo de sustrato, en función de las modificaciones que, como fuente de nutriente, sufre el sustrato, y de las estrategias que concomitantemente desarrollan diferentes grupos fúngicos. Reconoce cuatro grupos de hongos, basados en la clasificación de Grime (1979) para plantas vasculares: ruderales, competidores, "stress-tolerantes" y sobrevivientes-escapistas. Estas categorías surgen de considerar dos condiciones del habitat: el "stress" y la perturbación. El primero se define esencialmente como una disminución de los nutrientes; la perturbación como alteraciones de la "normalidad" del habitat, causada por herbívoros, patógenos, cambios climáticos, actividad del hombre, etc. En las plantas vasculares el aumento de "stress" o de perturbación, determina una disminución de la biomasa, pero en el caso de los microorganismos en general, y de los hongos en particular, no se produce necesariamente una reducción. Un ejemplo de perturbación del habitat que reduce la biomasa es la aplicación de fungicidas. Sin embargo, la imposición de un nuevo medio sobre uno ya existente, como por ejemplo la caída de hojas en otoño, da como resultado una perturbación en la hojarasca, pero la biomasa fúngica no se reduce, sino que queda más "diluida" en la masa final de sustrato. Los cuatro grupos fúngicos propuestos se definen como:

Ruderales:

aquellos hongos que pueden desarrollarse bajo condiciones de bajo "stress" y alta perturbación del habitat. Se trata de organismos de vida corta y alta capacidad de reproducción. Poseen la propiedad de explorar habitats que son potencialmente productivos, pero sólo son favorables para su desarrollo en forma discontinua. Este tipo de

organismos caen dentro de la definición de zimógenos dada por Winogradsky (1924). También pueden incluirse en este grupo los hongos del azúcar descritos por Burges (1939) y definidos por Garrett (1951) como "aquellos que tienen alto grado de crecimiento, y capacidad para germinar rápidamente". Esta combinación de características permite que los hongos ruderales actúen como pioneros en la colonización de una gran variedad de sustratos. Alcanzan una gran distribución pero son incapaces de crecer en forma extensiva. Generalmente forman una colonia densa pero limitada y, muy esporulada.

Competidores:

son los hongos que se desarrollan en un habitat con poco "stress" y poca perturbación. Incluyen a los organismos que son buenos competidores, que maximizan la captura del recurso en una situación productiva de poca perturbación.

"Stress"-tolerantes:

se desarrollan en habitats de mucho "stress" y poca perturbación. Aparecen cuando los nutrientes se agotan y la competencia es eliminada por desaparición de los hongos menos capaces. Son organismos regularmente estables y poco afectados por las fluctuaciones en el nivel de materia orgánica. Se los encuentra descomponiendo los sustratos relativamente más resistentes, como la celulosa, lignina, y ácidos húmicos en el suelo, y sustratos de origen animal como quitina y queratina. Crecen extensivamente pero fructifican poco. Las especies de este grupo se asemejan a las autoctonas descritas por Winogradsky (1924).

Sobrevivientes y escapistas:

son característicos en habitat con mucho "stress" y mucha perturbación. Ejemplos de este tipo de habitats son: el filoplano, suelos anegados, raíces en suelos anegados, suelos salinos, sustratos donde se han aplicado fungicidas, etc. Puede estar formado por un grupo de especies, o tratarse de una especie en particular. Tienen características fisiológicas y morfológicas que les permiten desarrollar en condiciones adversas para la mayoría de los hongos.

También los habitats pueden clasificarse según las categorías anteriores, en función de los mismos parámetros utilizados para los hongos (figura III d). Sin embargo, la experiencia demuestra que los habitats no son estáticos. Garrett (1951) puntualizó que, mientras una sucesión de plantas superiores hacia una comunidad climax tiende a perfeccionar el habitat, "una sucesión de organismos heterotróficos ocasiona un progresivo deterioro en la capacidad del sustrato para soportar un crecimiento posterior, a causa de que el sustrato es finito y se agota". Por lo tanto, un determinado habitat puede variar, cuando es colonizado, de una categoría a otra de las antes señaladas. En un determinado momento puede estar entre A y B a lo largo de una línea que los une y, más tarde, entre B y C. Del mismo modo son reemplazadas gradualmente las especies colonizadoras del sustrato. Si consideramos los diferentes tipos de habitats que presentan las características de A, es más realista pensar en una pirámide de líneas de A hacia B, como se representa en la figura III e. El habitat tipo A se caracteriza principalmente por la flora zimógena. En el gráfico se representan tres de los muchos ejemplos que existen de esta flora, los ruderales, los termófilos y los parásitos obligados u hongos biotróficos. Cualquiera de éstos podrían ser los primeros colonizadores de un determinado habitat. En cada caso existen escalones que conducen a B, donde encontramos a las especies con buena capacidad saprofitica. En la línea entre B y C, los nutrientes son utilizados progresivamente, y las especies son eliminadas hasta que sólo perduran las "stress"-tolerantes. En algunos puntos de esta línea muchas especies pueden alcanzar un equilibrio entre su capacidad para producir enzimas y su capacidad para utilizar los nutrientes solubilizados. En tal caso puede producirse, por ejemplo, un exceso de glucosa en la descomposición de la celulosa. Esto permite crecer a los saprófitos secundarios (Hudson, 1963). En tal situación, los nuevos nutrientes producidos cierran una curva hacia A, y las especies ruderales toman posesión del habitat.

Los organismos autóctonos se ubican principalmente en C, y consisten principalmente de especies estériles, Basidiomycetes y, proba-

blemente otros grupos. Los hongos micorrícicos pueden ubicarse aquí y, algunas veces, a lo largo de una línea diagonal entre C y A, hacia los parásitos obligados o biótrofos.

Las especies presentes en un habitat en estado D, constituyen un complejo de sobrevivientes de C y evadidos de A y B. Los suelos anegados periódicamente son un buen ejemplo donde se observa el paso de un habitat en condiciones B o C, a D, y por lo tanto de la micoflora. Halimione portulacoides crece en las partes más altas de pantanos salinos. Durante los meses de verano, cuando la planta no está cubierta por el mar, viven en las raíces muchas especies esporuladas. Sin embargo, después de la primera inundación, disminuye su frecuencia y aumenta la de las especies estériles. Chryosporium pannorum es una de las pocas especies encontradas cuando se someten los sustratos a bajas temperaturas, y a los efectos de fungicidas. Es un organismo evidentemente psicrófilo, y se ha comprobado en experiencias de laboratorio que detoxifica los fungicidas. Tanto las especies estériles de los suelos anegados como C. pannorum, también viven sobre sustratos en condiciones normales. Por lo tanto, se los puede considerar como organismos "sobrevivientes", cuando aparecen en suelos anegados o sustratos con bajas temperaturas, respectivamente.

Dendryphiella salina es un ejemplo de hongo "escapista". Se lo encuentra siempre asociado a condiciones salinas. Esto no es solo consecuencia de un requerimiento absoluto de sal (a pesar que ella es necesaria para la descomposición de la celulosa), sino que ella le es imprescindible para restringir el crecimiento de los competidores, lo que le permite "escapar" de la competencia de otras especies.

Estos ejemplos muestran que existe un equilibrio entre grupos de hongos. Este equilibrio de una idea del nivel del factor de perturbación. Cuando ese factor es eliminado, puede restablecerse la micoflora normal.

Cuando se analiza la ecología fúngica en función de estas cuatro categorías y de sus estados intermedios, observamos una sucesión de eventos al movernos de A a B y C. En A existe baja diversidad ini-

cial de especies sobre cualquier sustrato. Cuando los ruderales germinan y crecen, el índice de diversidad alcanza un pico desde el cual, progresivamente declinará hacia C. Debemos preguntarnos, en que parte de esta secuencia hay una micoflora climax, o un grupo dominante de especies; y si existe realmente un estado tal en los ecosistemas fúngicos.

Si analizamos bajo estos conceptos el habitat de la superficie de la hoja, podemos considerarlo un habitat hostil, como consecuencia de las grandes fluctuaciones de temperatura, nivel de desecación e incidencia de rayos UV. Por lo tanto tiene características de habitat tipo D, con mucho "stress" y alto índice de perturbación. Si de la superficie de la hoja se lavan por métodos adecuados las esporas de los organismos ruderales, los habitantes de ese medio pueden ser aislados fácilmente. Forman un conjunto de organismos entre los que se encuentran, Alternaria spp., A. pullulans, B. cinerea, Cladosporium spp., E. purpurascens, S. roseus y Rhodotorula spp. La mayoría exhibe características morfológicas o fisiológicas que les permiten colonizar satisfactoriamente este habitat. Pueden ser colocados en el grupo D o, en muchos casos, entre C y D, según las características del habitat particular. Sin embargo, la función de estos organismos no es clara. Si no crecen activamente después que la hoja cae al suelo, se los puede ver como escapistas, usando las condiciones hostiles de la superficie de la hoja para escapar a la competencia. Pero si se desarrollan en el suelo, serían entonces sobrevivientes de la superficie de la hoja.

Los organismos ruderales sobre las hojas se encuentran generalmente en forma de esporas. Pero pueden llegar a desarrollar si el factor de perturbación (falta de agua, temperatura, rayos UV) se anula. Estos primeros colonizadores de las hojas pueden formar microesclerocios cuando llegan al habitat los competidores (Pugh & Buckley, 1971 a y b). Los patógenos pueden ser considerados también parte de la flora zimógena, ya que por su ubicación en el interior del sustrato, no tienen competencia. Los parásitos facultativos, sin embargo, son difíciles de ubicar. Ciertas especies pueden colocarse cerca de A, mientras que otras deben ser ubicadas cerca de B, o aún entre B y C.

FIGURA III

MODELOS DE COLONIZACION FUNGICA DE TEJIDOS VIVOS SENESCENTES Y MUERTOS

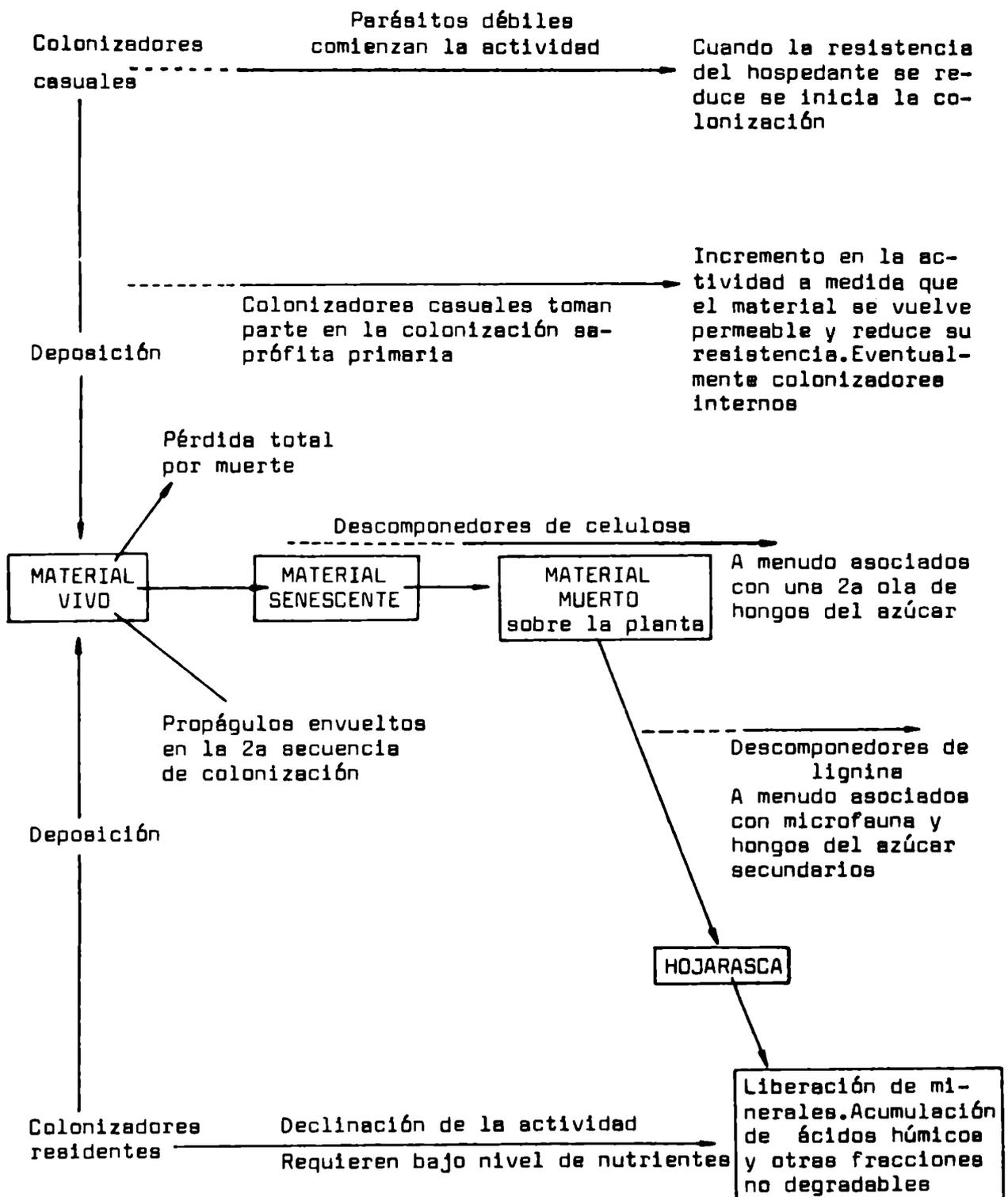
| Tejido senescente | Tejido muerto | | |
|-------------------|---|---|----------------------------------|
| estado 1ario | estado 1 | estado 2 | estado 3 |
| Parásitos débiles | Saprófitos primarios (hongos del azúcar) Viven sobre azúcares y compuestos carbonados más simples que la celulosa. | Celulolíticos y saprófitos secundarios asociados, que comparan los productos de la descomposición de la celulosa. | Lignolíticos y hongos asociados. |

a- Según Garrett (1963)

| VIVO | SENESCENTE | MUERTO |
|--|---|--|
| <p>Ascomycetes y F.I.</p> <p>Pueden ser específicos o estrictos</p> <p>Ej: <u>Leptosphaeria sacchari</u> sobre caña de azúcar.</p> <p><u>Gnomonia errabunda</u> sobre hojas de haya.</p> <p><u>Readeriella mirabilis</u> sobre hojas de <u>Eucalyptus</u>.</p> | <p>Saprófitos primarios comunes</p> <p><u>Alternaria tenuis</u> (<u>A.alternata</u>)</p> <p><u>Epicoccum nigrum</u></p> <p><u>A. pullulans</u></p> <p><u>Botrytis cinerea</u></p> <p>En los trópicos:</p> <p><u>Nigrospora</u></p> <p><u>Curvularia</u></p> <p>Saprófitos primarios restrictos</p> <p>Ascomycetea y F.I.</p> <p><u>L.microscopica</u> sobre pestos.<u>F.bacillare</u> sobre <u>Pinus</u>,</p> | <p>Saprófitos secundarios</p> <p>(I) Ascomycetes y F.I.</p> <p>(Ia)</p> <p>(Ib)</p> <p>(II) Basidiomycetes</p> <p>(Ic)</p> <p>(III) _ _ _ _</p> <p>(habitantes del suelo Ej: <u>Mucorales</u>, <u>Penicillium</u>)</p> |

b- Según Hudson (1968)

FIGURA III (cont.)



c Según Bell (1974)

FIGURA III (cont.)

(B) NUTRIENTES DISPONIBLES
Suelo normal (Agar-rico)

Superficie de las raíces
Rizosfera
Acumulación de hojas

(A) NUTRIENTES DISPONIBLES,
PERO LA ELEVADA PERTUR-
BACION REDUCE SU UTILI-
ZACION

"Compost"
Suelos de manejo

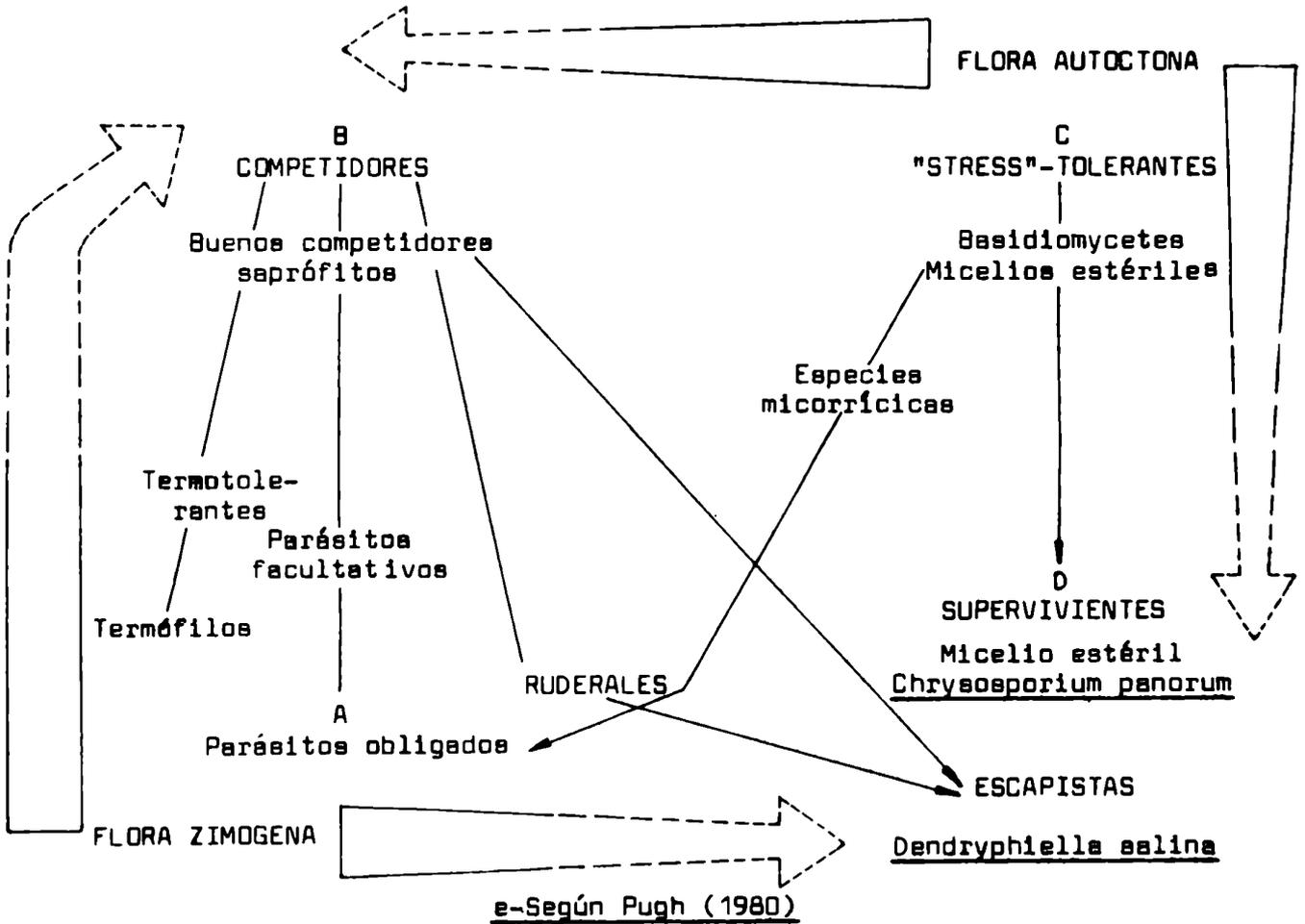
(C) CONDICIONES DE HAMBRE EN EL
SUELO

Horizontes profundos
Suelos forestales no pertur-
bados (Agar-agua)

(D) FALTA DE NUTRIENTES,
MUCHA PERTURBACION

Suelos inundados, salinos, se-
cos, frios o calientes
Habitats con tratamientos con
biocidas
(Agar-agua + fungicidas)

d-Según Pugh (1980)



OBJETIVOS

La mayoría de los estudios de la filosfera se han llevado a cabo en el hemisferio norte y, en Europa y Asia en particular. En el hemisferio sur, el número de trabajos sobre este tema es reducido. Los primeros fueron los de Lamb & Brown (1970) y Ruscoe (1971) en Australia. En América se han realizado estudios relacionados a este tema, como los de ecología de microorganismos de la hojarasca (Gamundí et al., en prensa), y suelo (Godeas, 1977) de Nothofagus dombeyi en Argentina. Pero no existen trabajos sobre la filosfera, con excepción del comenzado recientemente en Pinus taeda en Argentina (Venedikian, comunicación personal), y ciertas referencias circunstanciales en el estudio de degradación de hojarasca de Pinus radiata en Chile (Bunater, 1981).

Con base en estos antecedentes nos pareció de interés iniciar en nuestro país el estudio de este habitat, y se eligió para ello la filosfera de Eucalyptus viminalis. Este género junto con Pinus spp. constituyen las especies maderables más cultivadas en la Pcia. de Buenos Aires. Además, en las mismas plantaciones donde se llevó a cabo esta investigación, se están realizando estudios sucesionales de las especies de macro y micromycetes xilófilas y xilófagas en árboles vivos, madera estibada y tocones (Lopez, en prensa). Los datos aportados por este trabajo, permitirán tener un amplio espectro de las poblaciones fúngicas que colonizan esta especie en su totalidad.

Los únicos antecedentes sobre la filosfera del género Eucalyptus, son los de degradación de hojarasca de E. regnan (Macaully & Thrower, 1966), y el ya citado de Lamb & Brown (1970) sobre la filosfera de E. stellulata, ambos en Australia.

El estudio fue desarrollado de acuerdo con el siguiente plan:

- 1) reconocimiento taxonómico de las especies fúngicas de la filosfera de E. viminalis en plantaciones de la Pcia. de Buenos Aires.
- 2) determinación de la relación de las especies aisladas con el hospedante.

- 3) determinación de las variaciones cuantitativas y de fructificación de las especies aisladas, en función del estado fisiológico-edad de la hoja (jóvenes, maduras, senescentes y secas sobre la planta) y estaciones del año.
- 4) observación de las variaciones cuali y cuantitativas de la comunidad, en función de los factores antes señalados.
- 5) comparación de la flora encontrada, con la observada sobre Eucalyptus spp. australianos.

MATERIALES Y METODOS

1. Sitio de muestreo1.1. Ubicación geográfica

Se seleccionó un "stand" de E. viminalis perteneciente a las plantaciones de Fiplasto SA, ubicado sobre el Camino Ramallo-Siderurgica, en la localidad de Ramallo (Lat. 33° 29'S; Long. 60° 00'O), al NE de la Pcia. de Buenos Aires. Dicho "stand" se encuentra situado aproximadamente a mil quinientos metros de la costa, y sobre las barrancas del río Paraná. Se compone de aproximadamente 1280 plantas que contaban 3-4 años de edad en el momento del muestreo. La selección de esa edad se realizó para facilitar la recolección de las muestras de hojas, que en árboles de edad más avanzada se encuentran a mayor altura.

1.2. Clima

El territorio de la Pcia. de Buenos Aires está ubicado dentro de la faja típicamente templada de la superficie terrestre. Según la descripción de Burgos (1968), su territorio, como la mayor parte del territorio de la República Argentina, tiene un clima eminentemente oceánico, acentuado en esta provincia porque es una saliente continental sobre el océano Atlántico y, limita al NE con el río de la Plata, y con las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay, equivalentes por su magnitud a un mar interior.

La temperatura media de verano tiene intensidades semejantes a las de otras regiones templadas de la tierra; sin embargo, en invierno, los valores de temperatura en el mes más frío, que están entre 6° y 10° C, corresponden, en el hemisferio norte, al dominio de los cli-

mas tropicales. Otra característica particular del clima de esta provincia radica en que el período otoñal es más cálido que el primaveral. Esto se ve más acentuado en la mitad oriental del territorio. Se interpreta como consecuencia de la gran cantidad de energía que cede el océano durante el período de enfriamiento del hemisferio, mientras que, en el calentamiento primaveral, esa energía puede almacenarse en el mismo, sin elevar considerablemente la temperatura de su superficie.

La amplitud de variación anual de temperatura es de 12° y 13° C en los lugares de clima con mayor influencia marítima, a 16° C en el oeste de la provincia, donde el clima es más continental. Sin embargo, aún este valor es mucho menor que el de los típicos climas continentales del hemisferio norte.

Las precipitaciones máximas varían entre 700 y 1100 mm, y se producen en el semestre más cálido del año, no obstante, se observa en toda su extensión, salvo en la región sur, una disminución de las lluvias en enero, y a veces en febrero, que intensifica el período seco estival.

El período libre de heladas varía entre valores algo superiores a 320 días en el año, en la ribera media del río de la Plata, hasta valores menores a 160 días, en los partidos dominados por las sierras australes de la provincia.

En el extremo NE, debido a la influencia directa de los ríos de la Plata y Paraná, se observan diferencias significativas con el resto de la provincia. Como el sitio de muestreo se encuentra ubicado en la zona costera del Paraná, debemos hacer consideraciones particulares sobre esta región. El río resulta una corriente de agua relativamente caliente en invierno, que afecta la costa como consecuencia de una convección en la baja atmósfera, producida por el contraste de temperatura entre río y tierra (Burgos, 1944). En verano, el proceso inverso determina temperaturas más frescas en la franja sometida a esta circulación local. En esta región es donde se presentan las mayores precipitaciones (1100 mm), y es la que tiene el menor nú-

mero de días con probabilidades de heladas de la provincia. En San Nicolás, por ejemplo, se registra el 7 % de los años sin heladas.

Hoffmann (ined) realizó un análisis detallado de las características climáticas de la zona, y observó que en la costa del río Paraná se crean gradientes en casi todas las isolneas. A cierta distancia de la costa aparece una discontinuidad en los gradientes, que marca el límite físico de la zona costera. En dicha zona se registran los máximos relativos en la presión de vapor y las temperaturas mínimas; y las mínimas amplitudes térmicas, frecuencia de heladas y temperaturas máximas. Sólo en julio la temperatura máxima se comporta según el efecto latitudinal. Se observa que los efectos del río son mayores sobre las temperaturas mínimas que sobre las máximas, ya que los gradientes de temperatura mínima son los más altos. A continuación se indican los valores de los principales parámetros climáticos para la localidad de Ramallo, sobre datos del período 1951-1960, según Hoffmann (op. cit).

| Parámetros Meses | T máxima °C | T mínima °C | Amplitud térmica °C | Presión de vapor mb |
|---------------------|----------------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| Enero | 30.5 | 17.5 | 13.5 | 20.5 |
| Abril | 22 | 11.5 | 11 | 15 |
| Julio | 16.3 | 6 | 10 | 11 |
| Octubre | 22.5 | 11.5 | 12 | 15 |

En las figuras IV y V están representados los registros de temperatura media mensual y humedad relativa media mensual, para los períodos de muestreo en que se utilizaron técnicas de cultivo y de observación directa, respectivamente. Dichos períodos corresponden a marzo de 1979-febrero de 1980 y, agosto de 1981-mayo de 1982, res-

FIGURA IV

TEMPERATURA MEDIA MENSUAL Y HUMEDAD RELATIVA MEDIA MENSUAL
MARZO DE 1979-FEBRERO DE 1980

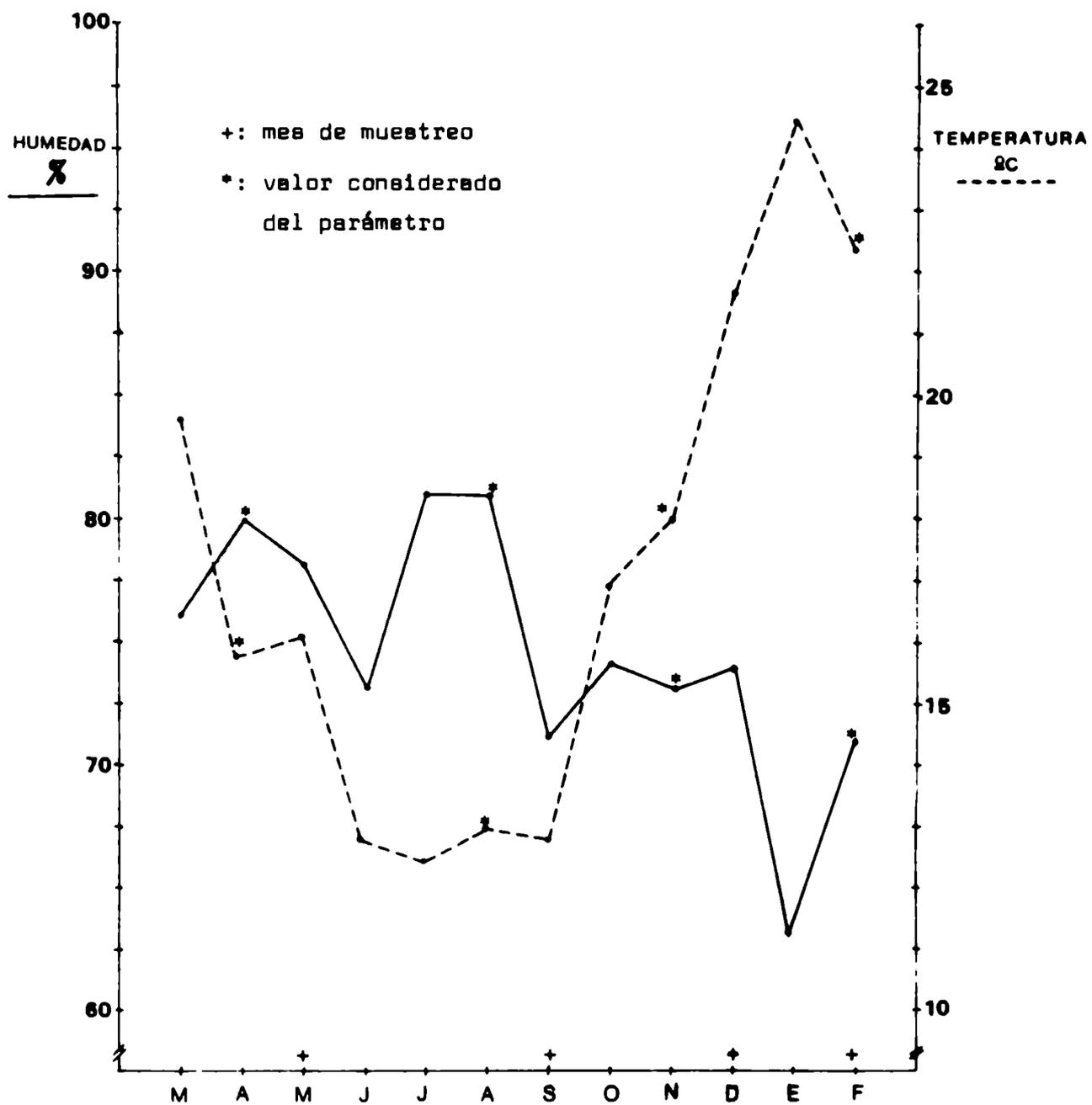
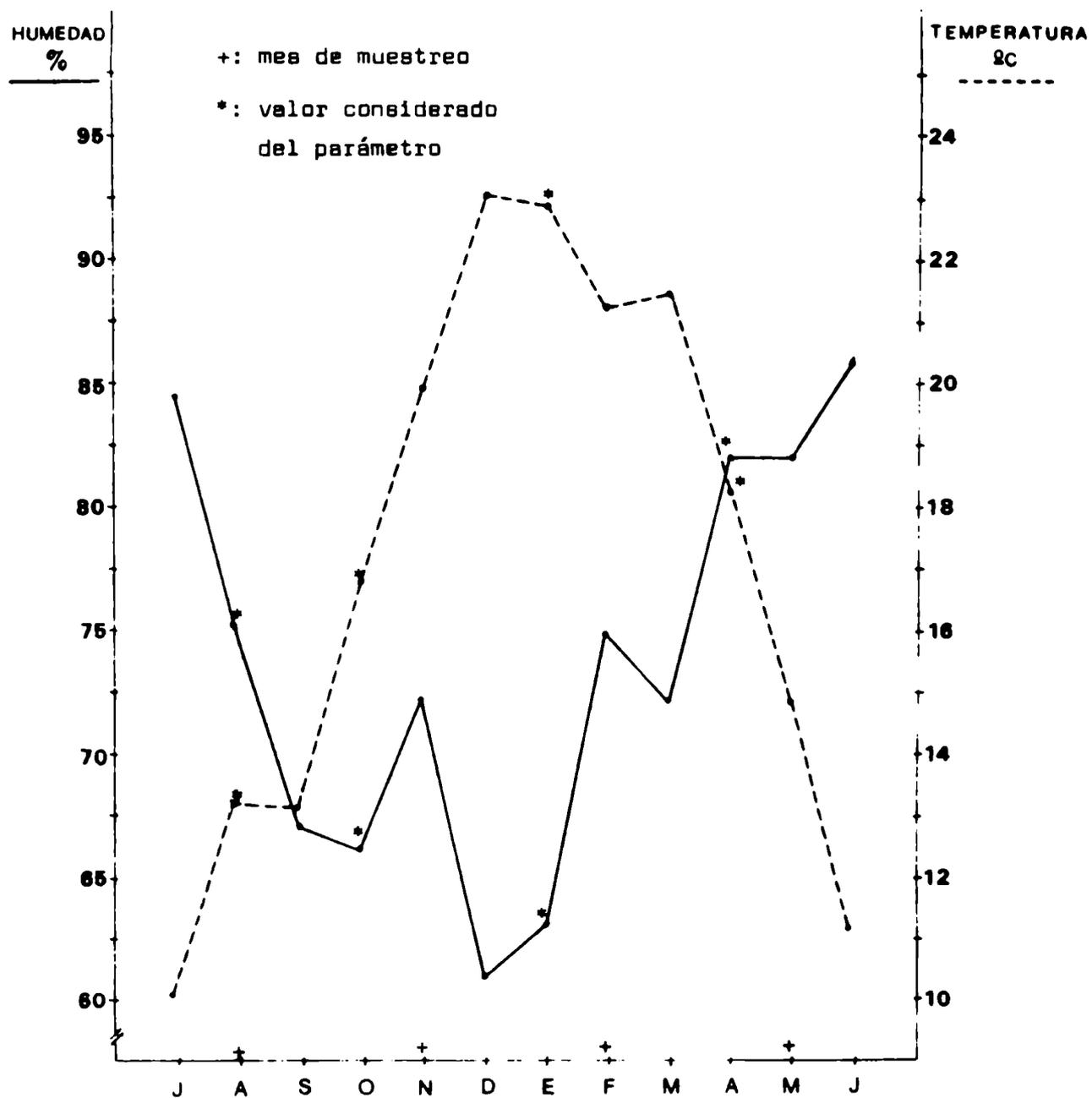


FIGURA V

TEMPERATURA MEDIA MENSUAL Y HUMEDAD RELATIVA MEDIA MENSUAL
AGOSTO 1981-MAYO 1982

pectivamente. Los datos fueron suministrados por la estación INTA de San Pedro, Pcia. de Buenos Aires. El signo + sobre las abscisas de los gráficos, señala el mes en que se realizó el muestreo de cada estación. Sin embargo, debido a que en la mayor parte de las estaciones los muestreos se realizaron en los primeros días del mes, hemos considerado que el desarrollo de los organismos va a estar más influenciado por los valores de los parámetros del mes anterior, que por los del mes correspondiente. El signo * señala, sobre los valores de las curvas, el valor de los parámetros que se tomó en cuenta para cada muestreo. Comparando de esta forma los valores de los parámetros del mes de muestreo de cada estación, entre los dos gráficos, observamos que no existen diferencias muy marcadas, con excepción de que en el verano e invierno del segundo período (figura V), la humedad relativa media mensual fue menor.

2. Muestreo

Se cortó una rama de la parte inferior de la copa, por medio de una tijera de podar extensible, en treinta árboles elegidos al azar dentro del "stand". Se tomó una hoja de cada estadio, en cada una de las ramas, para poder registrar los cambios de la micoflora con la edad y estado fisiológico de la hoja. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel estériles, separadas por estadio. Fueron desechadas las bolsas de polietileno usadas generalmente en este tipo de muestreo, debido al aumento de humedad que se produce en su interior durante el tiempo de traslado hasta el laboratorio. Este aumento de humedad puede incrementar la cantidad real de micelio existente en el momento de recolección de la muestra. Para el tratamiento con cámara húmeda se recolectaron en la misma forma hojas del suelo.

Los diferentes estadios de la hoja se reconocieron por tamaño y color, y por su posición relativa sobre la rama. Se realizó un muestreo previo el 8-I-1979, para obtener datos sobre la composición de

la micoflora, y puesta a punto de las técnicas de análisis. Con el objeto de registrar los cambios estacionales de las poblaciones fúngicas sobre los diferentes sustratos se realizó, durante un año, un muestreo por estación. Los correspondientes a las técnicas de aislamiento, se realizaron en las siguientes fechas: 4-V-1979, 3-IX-1979, 4-XII-1979 y 18-II-1980; mientras que los vinculados con las técnicas de observación directa se realizaron el: 20-VIII-1981, 9-XI-1981, 9-II-1982 y 8-V-1982. En el invierno del primer período de muestreo, 3-IX-1979, no se recolectaron hojas jóvenes debido a que en esa época del año no hay desarrollo de yemas y, las hojas más jóvenes que se encontraron, se consideraron ya maduras.

Todas las muestras fueron conservadas en heladera a 6°C hasta el momento de ser procesadas. Este período, sólo excepcionalmente sobrepasó las 48 hs después de su llegada al laboratorio.

3. Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron analizadas por medio de dos tipos de métodos: de aislamiento, y de observación directa. La secuencia de los pasos seguidos en cada caso se ilustran gráficamente en la figura VI.

3.1. Métodos de aislamiento

Consisten en la siembra de pequeños trozos de hoja en medios nutritivos semi-sintéticos apropiados, de tal modo que es posible aislar e identificar los organismos en cada trozo, y obtener datos de su frecuencia de aparición. En este estudio se utilizaron dos técnicas previas al aislamiento: lavado seriado de la superficie de la hoja, y esterilización superficial.

Se extrajeron 20 hojas al azar de las bolsas conteniendo las 30 muestras correspondientes a cada estadio. Para el tratamiento con

lavado seriado se cortaron, estérilmente y al azar, tres submuestras de 4 x 4 mm de cada hoja. Para el de esterilización superficial otras tres de 10 x 10 mm de las mismas hojas. Estas últimas fueron cortadas después del tratamiento, en submuestras de 4 x 4 mm. Esto da un total de 30 submuestras para cada estadio de la hoja y tratamiento. Este número se redujo a 20 (2 submuestras por hoja), a partir del muestreo del 3-IX-1979, después de comprobarse que esta reducción no modificaba la frecuencia final de los organismos aislados. Las submuestras de 4 x 4 mm constituyen la unidad de muestreo sobre la que se obtuvieron las frecuencias de cada especie.

3.1.1. Lavado seriado de la superficie de la hoja

Sobre la superficie de las hojas se puede encontrar a los hongos en tres etapas de su ciclo de vida: como micelio activo, como micelio fértil y como espore u otro propágulo de resistencia. Estos últimos pueden provenir de especies que en algún momento desarrollaron o desarrollarán sobre la hoja, o son esporas depositadas sobre este habitat, pero que nunca desarrollan (colonizadores casuales, transitorios o exótonos). Como uno de los objetivos de este trabajo es conocer las especies que se encuentran activas en el momento del muestreo (como micelio vegetativo o reproductivo), se aplicó la técnica de lavado seriado de la superficie de la hoja, de Kendrick & Burges (1962), adaptada de Harley & Waid (1955). Por medio de esta técnica se eliminan los propágulos de la superficie de la hoja, y el micelio, más adherido al sustrato, puede crecer sobre el medio de cultivo. A pesar de que no discrimina entre epifilos y endofilos, los primeros están más favorecidos en su desarrollo, porque generalmente presentan crecimiento más rápido en los medios de cultivo semi-sintéticos.

El lavado se realizó sobre las submuestras de 4 x 4 mm en forma separada para las de cada estadio de la hoja. Las 20-30 submuestras se colocaron dentro del aparato de lavado (Godeas, 1977), y se

realizaron 30 lavados con agua estéril agitada por aire estéril. La esterilización de éste se efectuó por medio de un filtro Sartorius SM 165-98, que contenía una membrana esterilizante Oxoid de $0,2 \mu$ de poro. Los lavados se realizaron con 100 ml de agua durante dos minutos. Los primeros 10 con agua más 0.05 % de Tween 80, y los 20 restantes sólo con agua estéril. El agregado de Tween 80 aumenta la tensión superficial, y por lo tanto la eficacia del lavado (Dickinson, 1965). Finalizado este proceso, las submuestras se dejaron secar durante 24 hs en cajas de Petri con papel de filtro estéril, para disminuir el desarrollo de bacterias. Pasado este período cada submuestra se cortó estérilmente en cuatro trozos de 2×2 mm, que se sembraron en forma equidistante, en una misma caja de Petri con medio de Cook (1954), adicionado con rosa de Bengala, para reducir el crecimiento bacteriano. Esta subdivisión se realizó para evitar el error que se comete cuando coexisten en una submuestra especies con diferentes tiempos o velocidades de desarrollo. Las de desarrollo rápido, pueden enmascarar a las lentas, y disminuir así su frecuencia real. Los cultivos fueron mantenidos a temperatura ambiente y luz natural.

En el muestreo previo del 8-I-1979 se ensayó el número de lavados necesarios para eliminar completamente las esporas de la superficie de las submuestras. Se realizaron en esa ocasión, y según se describió anteriormente, 40 lavados a 30 submuestras de hojas senescentes. De cada lavado se extrajo una muestra de 50 ml del agua de lavado. De cada una de ellas se sembró una alícuota de 0.5 ml en cuatro cajas de Petri con extracto de malta agarizado (ME), (según Ainsworth, 1971), que se cultivaron a temperatura ambiente y luz natural. Cada cinco lavados, se filtró una alícuota de 15 ml a través de una membrana Oxoid esterilizante de 0.2μ de poro. Posteriormente las membranas fueron colocadas en cajas con medio ME, y cultivadas a 25°C . Aproximadamente a los 25 lavados ya no se registró crecimiento de colonias por ninguno de los dos métodos. Se decidió, por lo tanto, que con 30 lavados estaba asegurada una buena eliminación de propágulos.

3.1.2. Esterilización de la superficie de las hojas

La esterilización superficial de las hojas elimina los organismos epifilos, de tal manera que es posible asegurar que los hongos aislados son endofitos. Comparando los resultados obtenidos por esta técnica con los de lavado superficial de la hoja, se pueden distinguir aquellos organismos que son únicamente habitantes del filoplano, o en qué momento se produce la penetración de los tejidos estudiados.

Los trozos de hojas de 10 x 10 mm se introdujeron en el mismo aparato de lavado usado para la técnica descrita anteriormente. La esterilización se efectuó separadamente para cada estadio de la hoja, durante un minuto y con 100 ml de solución de bicloruro de mercurio $0.1 \text{ P}/\text{V}$ (Pugh & Buckley, 1971 a), más 5 % de alcohol 96 %, para aumentar la tensión superficial, y de ese modo la eficacia de la esterilización (Hering, 1965; Ruscoe, 1971). Para permitir el contacto de la solución con toda la superficie de la muestra, se agitó con aire, esterilizado según se describió anteriormente. Inmediatamente después de la esterilización, se retiró la solución, y los trozos de hoja fueron lavados con agua estéril agitada por aire. Se realizó un primer lavado de un minuto de duración, con 200 ml de agua, seguido de otros cuatro de dos minutos, con 100 ml. Los trozos esterilizados superficialmente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 hs, del mismo modo que en la técnica anterior. Pasado ese período, se cortó de la parte central de cada trozo, una submuestra de 4 x 4 mm. Estas últimas no fueron esterilizadas directamente, para evitar la penetración de la solución esterilizante por los bordes cortados, que podría impedir el crecimiento normal del micelio. Cada submuestra se cortó posteriormente en trozos de 2 x 2 mm, los que se sembraron en una misma caja de Petri conteniendo medio de Cook (1954), con el agregado de rosa de Bengala. Fueron cultivados a temperatura ambiente y luz natural. Algunos organismos desarrollados se muestran en la fotografía de la lámina I.

3.1.3. Aislamiento

Entre los 10-15 días después de la siembra, los cultivos obtenidos por ambas técnicas fueron revisados con microscopio estereoscópico, para reconocer los diferentes micelios. Estos fueron repicados a tubos en pico de flauta con medio ME. Los organismos que se encontraban fértiles, y que podían reconocerse taxonómicamente, como A. alternata, C. cladosporioides y E. purpurascens, se repicaron a razón de una cepa por caja de Petri, mientras que los micelios estériles, fueron repicados en su totalidad. De este modo se obtuvieron 1856 cepas para ser identificadas.

3.1.4. Identificación de las cepas

Este fue uno de los mayores inconvenientes que se presentaron en el estudio, debido a que gran número de cepas, en especial aquellas de organismos endofilos obtenidas por esterilización superficial, eran estériles o de difícil fructificación en medios de cultivo semi-sintéticos. Además, cuando se produjo la fructificación, resultó difícil identificarlos, debido a que la mayoría están descritos sobre sustratos naturales.

Con el fin de inducir la fructificación de las cepas estériles, y conocer sus características sobre el sustrato natural, se ensayaron las siguientes técnicas en el orden en que se describen.

Cultivo en diversos medios semi-sintéticos

El primer paso fue sembrar las cepas aisladas en medio ME. Los cultivos se dejaron desarrollar a temperatura ambiente y luz natural. A los 10, 15 y 20 días de la siembra se revisaron e identificaron las cepas fértiles. Las que permanecieron estériles se reunieron en grupos por características micro y macroscópicas semejantes en el cultivo:

exudado, tipo de crecimiento, tipo y forma del borde de la colonia, características del micelio aéreo y sumergido, color del anverso y reverso y, presencia y color de la sustancia que difunde al medio de cultivo. Se tomaron 10 representantes de cada uno de estos grupos, y se cultivaron sobre los siguientes medios: agar-harina de maíz (CM); agar-avena (OM) (Clinton); agar-papa glucosado (APG), (según las fórmulas de Ainsworth, 1971), celulosa-agar (CM), (Eggina y Pugh, 1962), e infusión de hojas de E. viminalis-agar (IHA).

Inoculación sobre hojas

Este ensayo se realizó con aquellos grupos que no fructificaron en los medios señalados anteriormente, y para obtener datos de la fructificación sobre el medio natural, en aquellos que, a pesar de haber fructificado sobre los medios de cultivo semi-sintéticos, no podían ser identificados.

Las cepas estudiadas con este método se inocularon sobre hojas maduras y senescentes de E. viminalis, previamente esterilizadas en superficie con una solución de bicloruro de mercurio al 0.1 % más 5 % de alcohol 96 %, durante 90'. Luego se lavaron repetidamente con agua estéril y, finalmente, con agua destilada estéril. Las hojas fueron introducidas en tubos de Roux de 18 mm de diámetro, en cuyo interior se habían colocado 8 ml de solución nutritiva estéril. Esta solución permite mantener las hojas vivas por un tiempo más prolongado. La siembra se realizó con micropipeta Pasteur a partir de una dilución de esporas, en el caso de las cepas esporuladas, y a partir de micelio en las estériles. Se ensayó, además, con y sin ruptura de la cutícula de la hoja.

Irradiación de los cultivos con luz UV

Debido a que por los métodos anteriores no fue posible identificar un gran número de cepas, se intentó inducir la fructificación

con luz UV cercana, según las recomendaciones de Leach (1971). Se utilizaron tubos fluorescentes de luz negra, Phillips F.L. 40 $\text{W}/0.8^{\text{R}}\cdot\text{S}^{-1}$, ó, (F 40 8LB $^{-1}$), con espectro continuo entre 320 y 420 nm, con emisión máxima en 350 nm. Los tubos se colocaron en posición horizontal, con una separación de 20 cm, y a una altura de 40 cm de la superficie de las cajas. Se emplearon ciclos de 12 hs luz- 12 hs oscuridad. Este régimen de iluminación se acomoda bien, tanto para aquellos organismos que requieren luz y oscuridad (esporulación diurna), como para aquellos que son capaces de esporular bajo exposición continua (Leach, 1971). Las cepas se expusieron a los efectos de la radiación, después de permanecer 3-4 días en oscuridad después de la siembra, y permanecieron hasta completar la fructificación. En algunos casos este período superó los 60 días. Las cepas a ser irradiadas fueron sembradas sobre medio OM.

Identificación de cepas a partir del sustrato natural

A pesar de la aplicación de los métodos detallados anteriormente, quedó un remanente de cepas que, o no fructificaron, o la forma en que fructificaban en cultivo no alcanzaba para su identificación. A efectos de solucionar este inconveniente, se aprovechó la técnica de observación directa de las fructificaciones después de 48 hs en cámara húmeda. La comparación de estas fructificaciones con las logradas en cultivo, permitió la identificación de ciertas especies. Al mismo tiempo se obtuvieron cultivos de tales fructificaciones, que se compararon, por su morfología vegetativa, con los aislamientos estériles, y de ese modo se logró su identificación.

3.2. Métodos de observación directa

3.2.1. Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Para obtener datos sobre la distribución y densidad de las especies epifilas, en los diferentes estadíos de la hoja y en las cuatro estaciones del año, se observaron muestras de hojas con el MEB. El material fue recolectado como se indicó en el punto 2. Se extrajeron al azar, seis hojas de cada bolsa con la muestra correspondiente a cada estadío. De cada hoja se cortó al azar, una submuestra de 4 x 4 mm, que fueron deshidratadas en la siguiente serie de alcoholes: 30-50-70 y 100 %, y se montaron sobre pequeñas chapas de metal. En el primer muestreo se montó la mitad de las submuestras por la cara adaxial, y la otra mitad por la abaxial. En los siguientes, fueron montadas indistintamente debido a que no se observó diferencias significativas en las dos caras.

De cada submuestra se tomaron dos fotografías al azar, a 1200 aumentos. Utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{tamaño en cm} \times 10.000}{\text{aumento}} = \text{tamaño en } \mu$$

se puede conocer el área fotografiada, y el largo total de las hifas que son fotografiadas sobre dicha área. El largo de las hifas en cm se midió mediante un curvímetro. Promediando los valores de las 12 fotografías, se obtuvo una medida de la densidad del micelio para cada estadío de la hoja y para cada estación del año. Los resultados se expresaron en mm de hifa por mm^2 de superficie. Se comparó, además, la densidad y características del micelio sobre las nervaduras principales y fuera de ellas. Los resultados fueron tratados por análisis de la varianza.

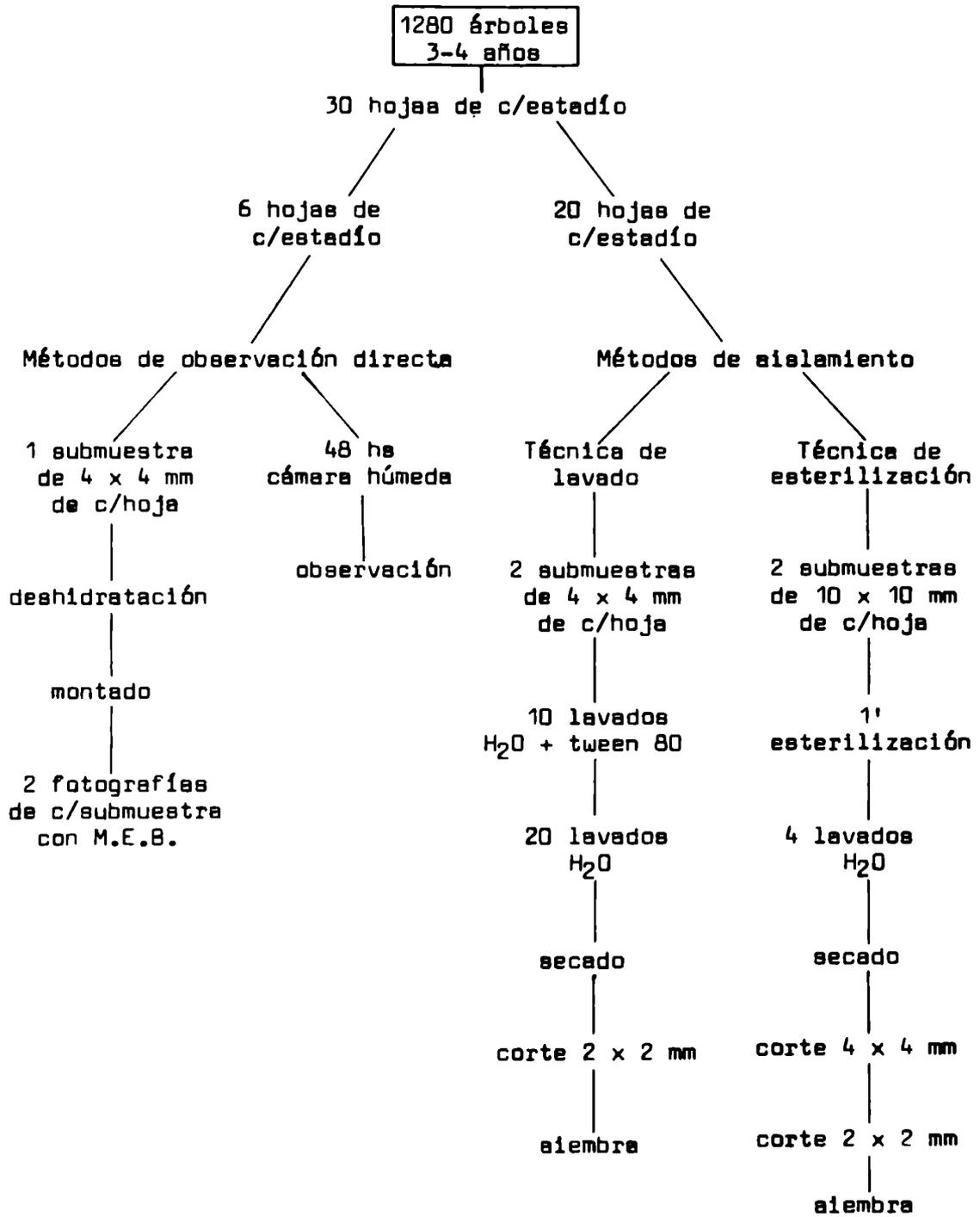
3.2.2. Observación de fructificaciones sobre el sustrato

Estas observaciones permiten conocer el estadio de la hoja y la época del año en que se producen las fructificaciones de cada especie.

Se revisaron las hojas con microscopio estereoscópico, luego de permanecer 48 hs en cámara húmeda. Los datos fueron consignados como presencia (+) o ausencia (-) de determinadas especies en cada estadio de la hoja y estación del año.

FIGURA VI

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



RESULTADOS

1. Métodos de aislamiento

En las tablas I y II se indican las frecuencias de las especies en cada estadio de la hoja y estación del año, registradas según las técnicas de lavado y esterilización superficial, respectivamente. En la tabla III, se señala el total de especies aisladas por las dos técnicas, agrupadas según los taxones superiores a que pertenecen. Como en la generalidad de los estudios de la filosfera, se encontraron únicamente hongos pertenecientes a los Deuteromycetes y Ascomycetes. El 79.5 % son Deuteromycetes, de los cuales el 61 % son Coelomycetes y el 39 % Hyphomycetes. El 20.5 % restante son Ascomycetes.

La mayor parte de los organismos aislados con alta frecuencia fueron identificados por lo menos a nivel genérico. Los no identificados, con excepción de Ascomycete 1 y Micelio estéril GRN, tienen frecuencias bajas y son esporádicos. El conjunto de cepas que permanecieron estériles se señala en las tablas I y II como "Micelio dematiáceo estéril". La frecuencia de este grupo no excede el 10 % en cada uno de los censos, excepto en el censo de hojas jóvenes de primavera, donde alcanza el 25 %. El hongo que figura como Micelio estéril GRN, a pesar de no producir fructificaciones, pudo separarse del grupo anterior, debido a sus características particulares de cultivo, que permitieron reconocerlo como un organismo diferente.

1.1. Identificación de las cepas

Los resultados de la inducción de fructificación de las cepas aisladas fueron los siguientes:

TABLA I (cont.)

| Estación | Otoño | | | | | Invierno | | | | | Primavera | | | | | Verano | | | | |
|---------------------|-------|------|------|------|---|----------|-----|-----|-----|---|-----------|-----|-----|-----|----|--------|-----|-----|----|--|
| | J | M | Sn | Sc | J | J | M | Sn | Sc | J | J | M | Sn | Sc | J | J | M | Sn | Sc | |
| Estadíos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Especies | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ?Cytoplea sp. | | | | | | | 5 | | | | 5 | 5 | | | 25 | 15 | 5 | | | |
| Micelio estéril GRN | | | | | | | 5 | | | | 5 | | | | | | | | 5 | |
| Sphaeropsidal 9* | | | | | | | 5 | 5 | | | | | | | | | | | | |
| Periconia sp.* | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| C. herbarum* | | | | | | | | 5 | 5 | | | | | | | | | | | |
| Z. eucalypti | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | | | |
| Phoma sp. PH2 | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 4 * | | | | | | | | | 5 | | | 15 | | | | | | | | |
| Leptosphaeria sp.* | | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | |
| Phoma sp. PH3* | | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 7* | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 6* | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | |
| Arthrinium sp.* | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | |
| Pleospora sp.* | | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | |
| C. gloeosporioides | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 5 | | | | |
| Sphaeropsidal 1* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5 | |
| Sordaria sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5 | |
| Total de especies | 9 | 10 | 12 | 11 | | | 16 | 13 | 9 | | 15 | 11 | 6 | 9 | 5 | 5 | 7 | 10 | | |
| Total de frecuencia | 2764 | 2629 | 2695 | 3095 | | | 320 | 295 | 265 | | 260 | 235 | 165 | 170 | 90 | 105 | 130 | 170 | | |

* Hongos considerados habitantes estrictos del filo plano

TABLA II (cont.)

| Estación | Otoño | | | | | Invierno | | | | | Primavera | | | | | Verano | | | | |
|----------------------------|-------|-------|------|-------|--|----------|------|------|------|---|-----------|------|------|-----|------|--------|------|----|----|--|
| | J | M | Sn | Sc | | J | M | Sn | Sc | | J | M | Sn | Sc | | J | M | Sn | Sc | |
| Estadios | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Especies | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Chryso sporium</i> sp.* | | | | | | | | | | | | | 5 | | | | 5 | | | |
| Nectriaceae* | | | | | | | | | | | | | | 15 | | | | | | |
| Sphaeropsidal 2* | | | | | | | | | | | | 5 | 5 | | | | | | | |
| Sphaeropsidales | 3.3 | 6.6 | 6.6 | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | |
| <i>C. lunata</i> | | | 3.3 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Penicillium</i> sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Total de especies | 3 | 6 | 10 | 10 | | | 7 | 7 | 8 | 0 | 5 | 8 | 11 | 2 | 7 | 7 | 7 | 11 | | |
| Total de frecuencia | 16.6 | 16.31 | 19.3 | 202.9 | | | 19.5 | 21.0 | 21.5 | 0 | 10.0 | 19.5 | 22.5 | 6.0 | 17.5 | 16.0 | 14.5 | | | |

* Hongos considerados habitantes estrictos del interior de la hoja

TABLA III

TOTAL DE ESPECIES AISLADAS POR LAS DOS TECNICAS DE AISLAMIENTO

DEUTEROMYCETES 79.5 %HYPHOMYCETES 39 %COELOMYCETES 61 %Alternaria alternataNigrospora oryzaeCladosporium cladosporioidesCladosporium herbarumFusarium sp.Penicillium sp.Epicoccum purpurascensCurvularia lunataPericonia sp.Arthrimum sp.Drechslera dematioideaeAureobasidium pullulans var.
melanigerum

MIGELIO ESTERIL

Micelio estéril GRN

Pseudodiplodia sp.Microsphaeropsis callistaPestalotiopsis oxyanthiAscochyta sp.Macrophoma smilacinaPhoma sp. PH1Phoma sp. PHLKPhoma sp. PH2Phoma sp. PH3? Cytoplea sp.Colletotrichum gloeosporioidesPseudoseptoria sp.

Sphaeropsidal 1

Sphaeropsidal 2

Sphaeropsidal 4

Sphaeropsidal 6

Sphaeropsidal 7

Sphaeropsidal 8

Sphaeropsidal 9

ASCOMYCETES 20.5 %Coccomyces martinaeZoellneria eucalyptiMycosphaerella sp. vel aff.Leptosphaeria sp.Sordaria sp.Pleospora sp.

Nectriaceae

Ascomycete 1

1.1.1. Cultivo en diversos medios semi-sintéticos

Gran parte de las cepas de Hyphomycetes, y ciertas de M. smilacina, Phoma sp. PH1, C. gloeosporioides y ?Cytoplea sp*, fructificaron sobre medio ME. Los restantes medios semi-sintéticos no aportaron nuevas especies, ni indujeron la fructificación de otras cepas estériles de las especies ya registradas.

1.1.2. Inoculación sobre hojas

Las cepas sembradas sobre hojas de E. viminalis dieron bajos resultados de fructificación. Este método permitió la identificación específica de C. gloeosporioides, y la fructificación de algunas cepas de P. oxyanthi que permanecían estériles en los medios de cultivo semi-sintéticos.

1.1.3. Irradiación de los cultivos con luz UV

Se obtuvieron resultados positivos con cepas de los siguientes géneros y especies: A. alternata, E. purpurascens, ?Cytoplea sp., C. martiniae, Z. eucalypti** , Phoma sp. PH1, PH2, PH3, M. callista, Mycos-

* Los cultivos de esta especie se enviaron al Dr. B.C. Sutton del Commonwealth Mycol. Inst., Kew, Inglaterra, quien indicó que podría tratarse de Cytoplea sp. pero que su identificación correcta sólo es posible si se conocen las características del conidioma en el sustrato natural. Posteriormente encontramos estas fructificaciones en hojas sobre la planta, pero sus características no coincidieron exactamente con las de dicho género. Pensamos que puede tratarse de un género cercano aún no descrito.

** Fue determinada por la Dra. M.E. Ranalli de Cinto, de la Facultad

phaerella sp. vel aff., Ascomycete 1, Leptosphaeria sp., Pleospora sp., Ascochyta sp. y Pseudoseptoria sp.

Las fructificaciones de C. martiniae obtenidas por este método resultaron abortivas en la mayoría de los casos, sólo en unas pocas cepas se obtuvieron fructificaciones anamórficas fértiles, que pensamos tenían afinidad con Phomopsis sp. En una sola fructificación se observó, dentro del estroma anamórfico, algunos ascos y ascosporas. Con sólo estas características morfológicas no fue posible la identificación. En el caso de Ascomycete 1, las características de cultivo tampoco fueron suficientes para su identificación taxonómica.

1.1.4. Identificación de cepas a partir del sustrato natural

Por este medio se verificó la presencia de C. martiniae, cuyo cultivo posterior permitió identificar las cepas del mismo organismo obtenidas por los métodos de aislamiento. A pesar de encontrarse fructificaciones de Ascomycete 1 sobre las hojas, no fue posible ubicarlo en ningún género conocido.

1.2. Análisis de las poblaciones fúngicas en función de su relación con el hospedante

Las especies aisladas por la técnica de esterilización superficial, pueden ser consideradas endofilas. Pero la técnica de lavado superficial no es discriminativa. A pesar que se encuentran más favorecidas las especies epifilas, permite el desarrollo de un cierto número de endofilas (tabla I). Por esa razón, si una especie fue aisla-

de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; y confirmada su identificación en cultivo por la Dra. I.J. Gamundí, del Instituto C. Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata.

da en hojas vivas, con una frecuencia significativamente mayor por la técnica de esterilización superficial, la consideramos endofila, y si lo fué por la de lavado superficial, epifila. Sin embargo, no debemos descartar que ciertas especies puedan cumplir una parte de su ciclo de vida como epifilas y otro como endofilas; o que compartan los dos ambientes al mismo tiempo.

Por lavado superficial fueron aisladas 35 especies, de las cuales sólo 26 pueden considerarse como habitantes estrictos del filoplasma de las hojas vivas (señaladas con * en la tabla I). Entre las especies aisladas con mayor frecuencia encontramos a: A. alternata, C. cladosporioides, E. purpurascens, Phoma sp. PH1 y M. callista. Con frecuencias menores a: Fusarium sp. Pseudodiplodia sp. P. oxyanthi. Las restantes pueden considerarse especies esporádicas que desarrollan únicamente cuando se registran condiciones muy especiales en el ambiente y en el hospedante, o como especies transitorias o exótonas, cuyas esporas no fueron eliminadas por la técnica de lavado.

El grupo de especies aisladas con mayor frecuencia coincide con el señalado para este habitat por Hudson (1968) y autores posteriores. M. callista es la única especie que hasta el presente no ha sido registrada en el filoplasma. Llama la atención la ausencia de A. pullulans, S. roseus y B. cinerea, tres organismos muy frecuentes en el filoplasma de otros vegetales superiores. Sin embargo, Kerling (1964) ya notó la ausencia de B. cinerea en el filoplasma de centeno, y Dickinson (1965) la ausencia de S. roseus y la baja frecuencia de A. pullulans en hojas de Halimione portulacoides.

Comparando estos resultados con los obtenidos para Eucalyptus spp. en Australia, observamos que en E. stellulata (Lamb & Brown, 1970), se registraron como especies más frecuentes a A. pullulans, Oidiodendron sp. y Penicillium spinulosum, ninguna de las cuales fue aislada en el filoplasma de E. viminalis estudiado en este trabajo. Sólo A. pullulans fue encontrado como endofilo, pero con frecuencia muy baja y distribución esporádica. Sin embargo, en E. regnans (Macauley & Thrower, 1966), se aislaron A. alternata, C. herbarum y E. purpurascens.

en hojas jóvenes y, máximas en las secas.

Cladosporium cladosporioides (figura VII b)

Como en el caso anterior es un organismo epifilo que penetra en el interior de la hoja únicamente cuando ésta está seca. Presenta una marcada estacionalidad, con máximos en otoño, disminución en invierno y primavera, y mínimos de frecuencia en verano. Estas características no coinciden con los resultados de otras investigaciones, en que aparece como un organismo estival (Dickinson, 1965; Lamb & Brown, 1970). No presenta un patrón homogéneo en cuanto a sus variaciones de frecuencia en los diferentes estadios de la hoja.

Epicoccum purpurascens (figura VII c)

Es un organismo epifilo que fue registrado con frecuencia menor que los dos anteriores. Del mismo modo que éstos, se encontró en todos los estadios de la hoja y, penetra en el interior sólo en las hojas secas. Presenta una marcada estacionalidad, disminuyendo su frecuencia a un mínimo en verano. Al igual que C. cladosporioides parece tratarse de una especie otoño-invernal.

Microsphaeropsis callista (figura VII d)

Se trata de una especie epifila que nunca coloniza el interior de la hoja. Su frecuencia es mucho más baja que la de las especies analizadas anteriormente. Parece estar afectada notablemente por las condiciones climáticas del verano, ya que no fue registrada en esa estación del año. Tiene frecuencias más elevadas en hojas maduras de invierno y jóvenes de primavera. Como se trata de uno de los primeros colonizadores de las hojas jóvenes, junto con A. alternata, C. cladosporioides y E. purpurascens, su baja frecuencia en los estadios posteriores de la hoja, podría deberse a la competencia con esas especies

que aumentan notablemente sus frecuencias en esos estadíos.

Macrophoma smilacina (figura VII e)

Esta especie fué aislada con alta frecuencia por las dos técnicas y en todos los estadíos de la hoja, con excepción de las hojas jóvenes de otoño y primavera. Su frecuencia, sin embargo, es relativamente mayor por la técnica de esterilización superficial. Por lo expresado en el punto 1.2. pensamos que se trata de una especie endofila. No presenta signos marcados de estacionalidad.

Coccomyces martinae (figura VII f)

Se trata de un organismo netamente endofilo, el cual sólo excepcionalmente, y con muy baja frecuencia, es aislado por la técnica de lavado superficial. No se registró su presencia en hojas jóvenes, y su frecuencia aumenta en las maduras y senescentes, disminuyendo en las hojas secas. Las frecuencias más altas fueron registradas en invierno, y las mínimas en otoño y verano. Parece tratarse de una especie invernal.

Cytoplea sp. (figura VII g)

Esta especie, que se presenta como endofila en la mayor parte de los censos, fué aislada también por la técnica de lavado superficial en los censos de primavera y verano. En las hojas jóvenes de primavera fué aislada únicamente del filoplano, en las maduras su frecuencia por esta técnica disminuye, mientras que en las senescentes y secas, desaparece. En las hojas jóvenes de verano se obtuvieron frecuencias similares por ambas técnicas. Sin embargo, en las maduras y senescentes la frecuencia por la técnica de lavado disminuye, aumentando la obtenida por esterilización superficial. Podríamos explicar estos resultados, considerando que este organismo realiza la coloni-

zación de las hojas jóvenes en primavera y verano, comportándose como epifilo en los primeros estadíos, y como epifilo y endofilo al mismo tiempo en los estadíos siguientes. En el otoño e invierno, sólo sobrevive si se encuentra en el interior de la hoja. Esto podría explicar la frecuencia baja y solo como endofilo, que presenta en las hojas jóvenes de otoño, y la alta frecuencia en las hojas maduras de la misma estación. Estas últimas corresponderían a las hojas jóvenes colonizadas en primavera y verano. Esta interpretación concuerda con la distribución estival de los censos con mayores frecuencias. Como en el caso de C. martiniae, se observan frecuencias altas en hojas maduras y senescentes, que disminuyen en las hojas secas.

Zoellneria eucalypti (figura VII h)

Es una especie endofila que vive en todos los estadíos de la hoja, pero con una estacionalidad otoño-invernal muy marcada. Su frecuencia presenta un máximo en las hojas secas y senescentes, y disminuye en las hojas verdes, como la generalidad de los organismos endofilos.

Micelio estéril GRN (figura VII i)

Se trata de un organismo endofilo que no coloniza las hojas jóvenes, con excepción de las de primavera. Como en el caso de Cytoplea sp., ésa podría ser la estación del año en que coloniza el sustrato, ya que en ese censo aparece únicamente por la técnica de lavado de la superficie.

1.4. Análisis de la comunidad de la filosfera en función de los estadíos de la hoja y de las estaciones del año

Como en el caso de las comunidades animales o de plantas superiores, en la filosfera de E. viminalis se registraron pocas especies

FIGURA VII

HISTOGRAMAS DE FRECUENCIA DE LAS ESPECIES CON MAYOR FRECUENCIA Y DISTRIBUCION, EN FUNCION DE LOS ESTADIOS DE LA HOJA, PARA CADA ESTACION DEL AÑO

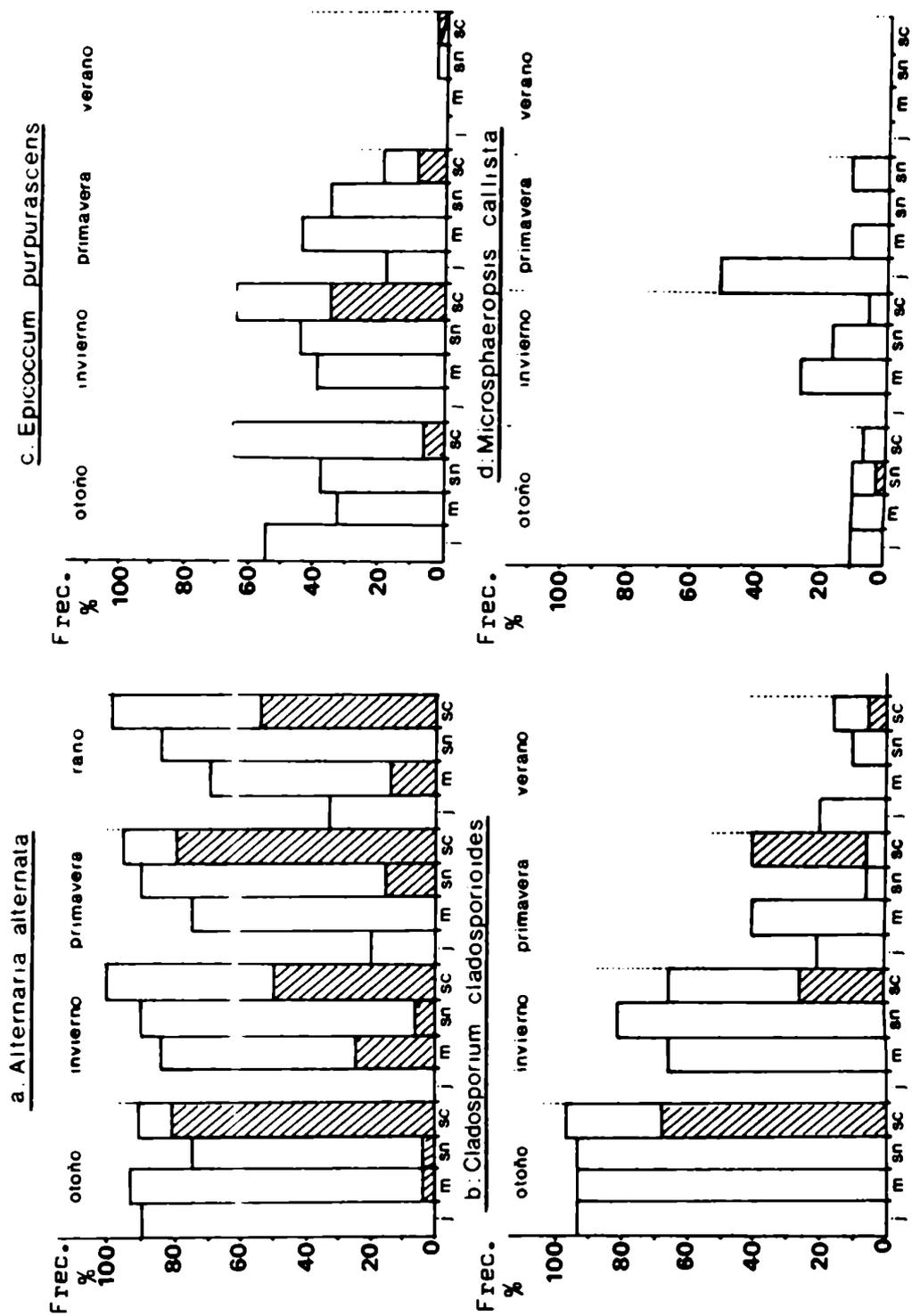


FIGURA VII (cont.)

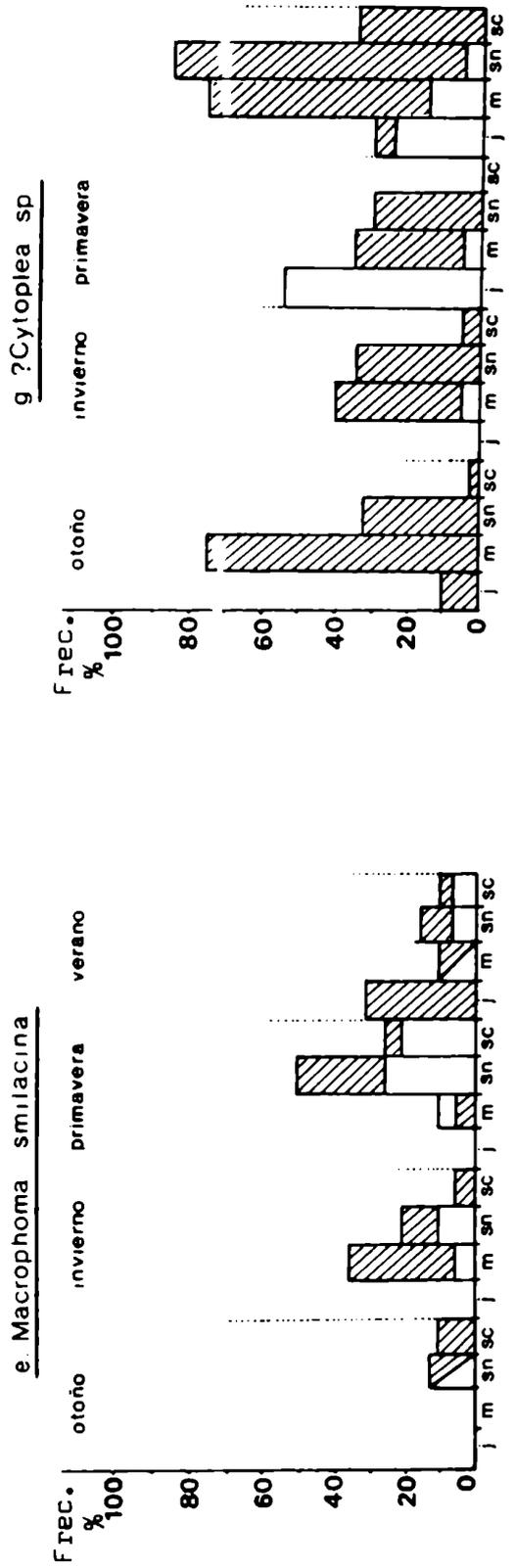
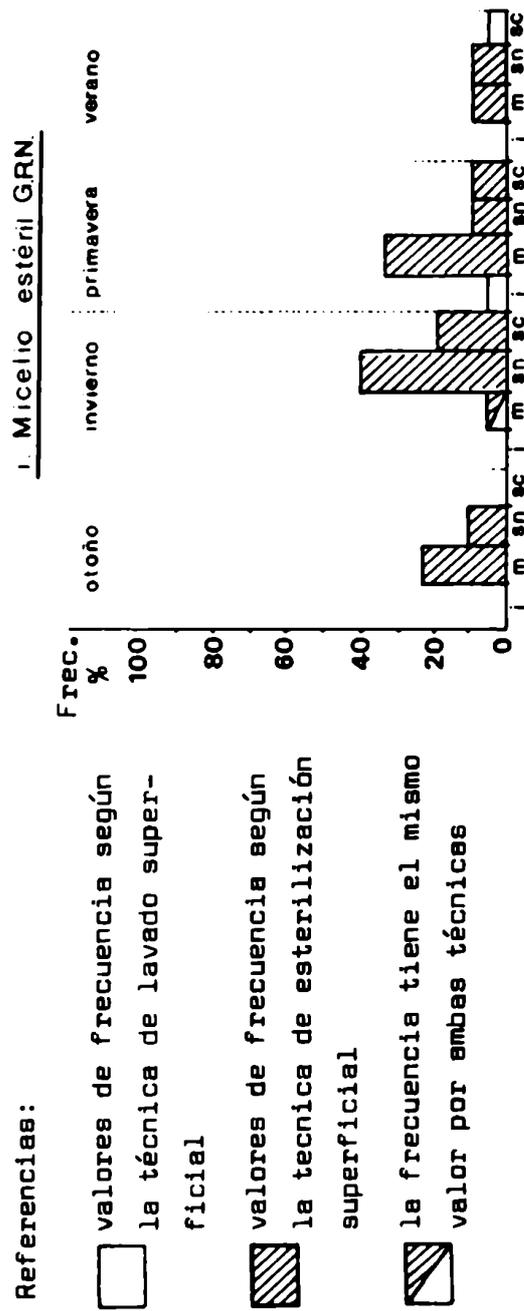


FIGURA VII (cont.)



con alta frecuencia, y numerosas con frecuencias bajas. Las de alta frecuencia generalmente se encuentran distribuidas en gran parte de los estadíos (censos), mientras que las de frecuencia baja son esporádicas. Esta característica se observa tanto en las especies del filoplano como en las endofilas.

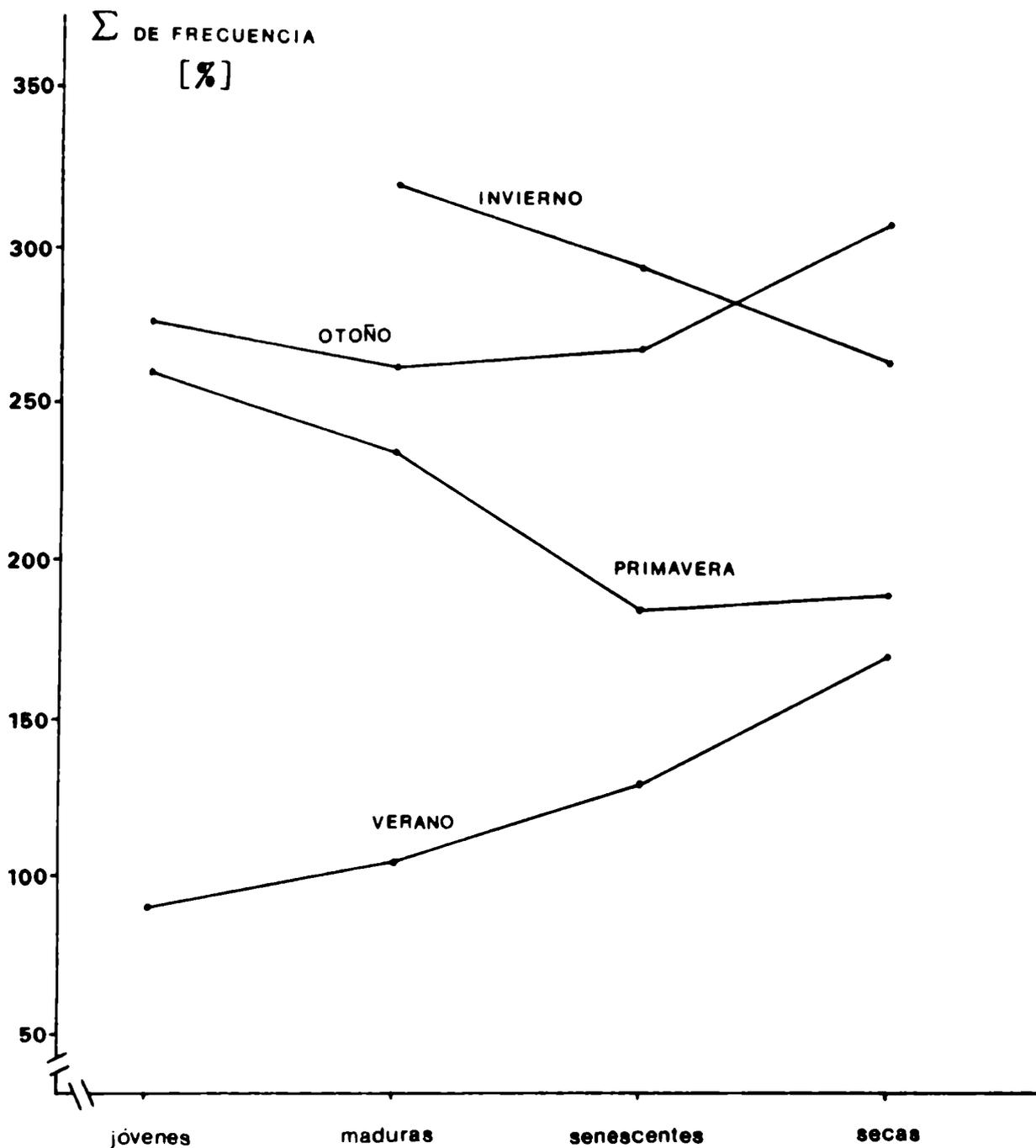
En la tabla I se señalan los valores de frecuencia acumulada y número de especies en cada censo, para los organismos del filoplano. En la figura VIII se graficaron los datos de frecuencia acumulada. Este último parámetro es mayor en los censos de invierno y otoño que en los de primavera y verano. Sin embargo, no existe un patrón regular en función de los estadíos de la hoja. Mientras en verano y otoño tienden a aumentar con la edad, en invierno y primavera disminuye. El número de especies tampoco sigue un patrón reconocible, solo observamos una leve disminución en el muestreo de verano.

En la tabla II y figura IX se registran y grafican los mismos parámetros analizados anteriormente, pero para las especies endofilas. La frecuencia acumulada en función de las estaciones del año no sigue un patrón tan evidente como en las especies del filoplano. Sin embargo, se aprecia que es regularmente más alta en invierno que en el resto de las estaciones. Con excepción del muestreo de verano, las especies endofilas tienden a aumentar su frecuencia acumulada con la edad de la hoja. Las mayores variaciones se registran entre las hojas jóvenes y maduras. A diferencia de lo que ocurre en el filoplano, se observa un gradual aumento del número de especies con la edad de la hoja, pero no hay diferencias significativas entre las estaciones del año.

Para realizar un análisis global de la comunidad fúngica de la filosfera, se elaboró la tabla IV, que comprende la totalidad de las especies aisladas, tanto epifilas como endofilas. Para cada especie, en cada censo, se eligió el valor de frecuencia más alto, ya sea éste el obtenido por la técnica de lavado, o por la de esterilización superficial. De este modo se pretende obtener la frecuencia que cada especie tendría, si hubiéramos podido aislar las especies epifilas

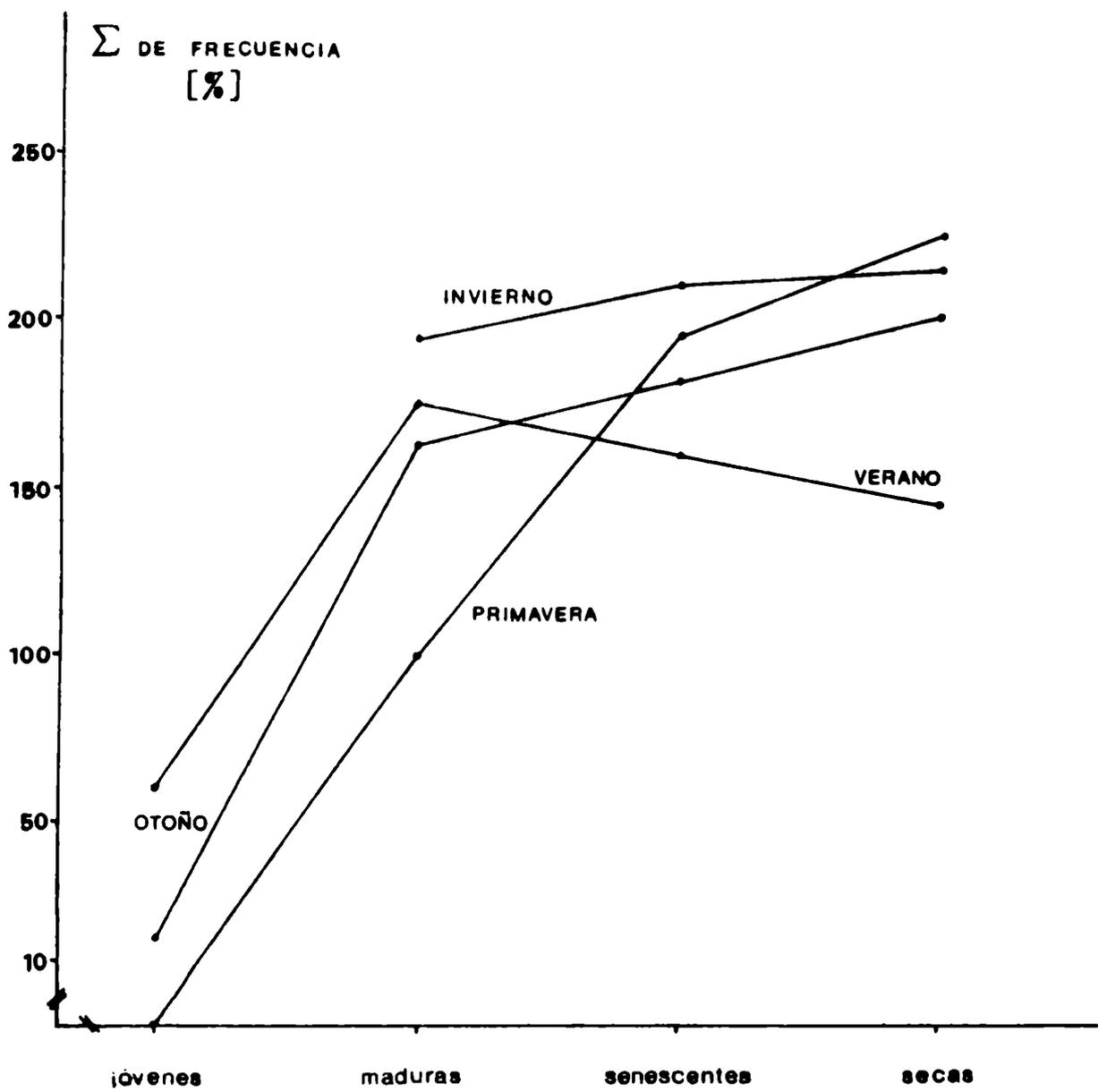
FIGURA VIII

SUMA DE FRECUENCIAS DE ESPECIES EPIFILAS EN FUNCION DE LOS ESTADIOS DE LA HOJA



. FIGURA IX

SUMA DE FRECUENCIAS DE ESPECIES ENDOFILAS EN FUNCION DE LOS ESTADIOS DE LA HOJA



y endofilas, al mismo tiempo, y en la misma submuestra. Dicha tabla consta de 42 especies y 15 censos o estadíos. Se señala el número total de especies y la frecuencia acumulada en cada censo. Estos últimos valores se grafican en la figura X. En dicho gráfico es más evidente que en las figuras VIII y IX, que la comunidad de la filosfera tiene valores de frecuencia acumulada más altos en invierno que en verano. El otoño y la primavera son intermedios entre los dos anteriores, con los valores del otoño más cercanos a los del invierno, y los de la primavera a los del verano. Si comparamos estos resultados con los valores de temperatura media mensual para el período de muestreo (figura IV), observamos que los valores máximos de frecuencia acumulada de especies se registraron en otoño-invierno, cuando la humedad tiene los valores máximos y la temperatura los mínimos. Los mínimos se registraron cuando la temperatura es máxima y la humedad mínima. Debemos recordar que los muestreos de mayo, septiembre y diciembre, se realizaron en los primeros días de cada mes, por lo que el desarrollo de las especies en esos muestreos estará más influenciado por las condiciones climáticas del mes inmediatamente anterior, que por las correspondientes al mes de muestreo. Por el contrario, el muestreo de febrero se realizó a mediados de mes.

Los valores de temperatura durante los muestreos de otoño y primavera, son intermedios entre los de invierno y verano. Sin embargo, los valores de humedad relativa en el muestreo de otoño, son más cercanos a los valores de invierno, mientras que los de primavera son más cercanos a los del verano. La frecuencia acumulada mayor en el muestreo de otoño con respecto al de primavera, parece estar reflejando una mayor dependencia de los organismos de la filosfera, de la humedad que de la temperatura.

En todas las estaciones del año, la micoflora registra las menores frecuencias en las hojas jóvenes, hay un aumento significativo en las maduras, un pico en las senescentes, y una disminución en las hojas secas. Este patrón es semejante al seguido, hasta las hojas senescentes, por la mayor parte de la flora epífila y endófila en for-

TABLA IV
FRECUENCIAS DEL TOTAL DE ESPECIES AISLADAS POR AMBAS TECNICAS*

| Estación | Otoño | | | | Invierno | | | | Primavera | | | | Verano | | | |
|---------------------------|------------|------|------|------|----------|----|----|-----|-----------|----|----|----|--------|----|----|-----|
| | J | M | Sn | Sc | J | M | Sn | Sc | J | M | Sn | Sc | J | M | Sn | Sc |
| Estadíos | 1 | 2 | 3 | 4 | | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| Especies | Mide censo | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>A. alternata</i> | 90 | 93.3 | 76.6 | 93.3 | | 85 | 90 | 100 | 20 | 75 | 90 | 95 | 35 | 70 | 85 | 100 |
| <i>N. oryzae</i> | 3.3 | | | | | | | | | 5 | | | | | | |
| <i>Fusarium</i> sp. | 3.3 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | | 5 | | | | 10 | | 5 | | | | |
| <i>C. cladosporioides</i> | 93.3 | 93.3 | 93.3 | 96.6 | | 65 | 80 | 65 | 20 | 40 | 5 | 40 | 20 | | 10 | 15 |
| <i>Pseudodiplodia</i> sp. | 3.3 | | 3.3 | 10 | | | | | | | 5 | | | | | |
| <i>Penicillium</i> sp. | | 6.6 | | 6.6 | | | 5 | | | | | | | 5 | | 5 |
| <i>E. purpurascens</i> | 56.6 | 33.3 | 36.6 | 66.6 | | 40 | 45 | 65 | 20 | 45 | 35 | 20 | | | 5 | 5 |
| <i>Phoma</i> sp. PH1 | 3.3 | 6.6 | 6.6 | 13.3 | | 10 | 5 | | | | | | | | 15 | 10 |
| <i>M. callista</i> | 10 | 10 | 10 | 6.6 | | 25 | 15 | 5 | 50 | 10 | | 10 | | | | |
| <i>P. oxyanthi</i> | | 3.3 | 10 | | | | | 10 | | 10 | | 5 | | | 5 | 10 |
| Ascomycete 1 | | 3.3 | | 3.3 | | 5 | | | | | | 25 | | | | 5 |
| <i>C. lunata</i> | | | 6.6 | 3.3 | | | | 5 | | | | 5 | | | | |
| <i>Ascochyta</i> sp. | | | 3.3 | | | | | | 5 | 10 | 5 | | | | | |
| <i>M. emilacina</i> | | | 13.3 | 10 | | 35 | 20 | 5 | | 10 | 50 | 25 | 30 | 10 | 15 | 10 |
| <i>Phoma</i> sp. PHLK | | | | 3.3 | | 5 | | | | | | 5 | | | | |
| <i>C. martiniae</i> | | 26.6 | 50 | 3.3 | | 75 | 90 | 70 | | 15 | 70 | 5 | | 55 | 30 | 10 |

TABLA IV (cont.)

| Estación | Otoño | | | | | Invierno | | | | | Primavera | | | | | Verano | | | | |
|---------------------|-------|------|------|-----|--|----------|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|--------|----|----|----|--|
| | J | M | Sn | Sc | | J | M | Sn | Sc | | J | M | Sn | Sc | | J | M | Sn | Sc | |
| Estadíos | 1 | 2 | 3 | 4 | | | 5 | 6 | 7 | | 8 | 9 | 10 | 11 | | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| Especies | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M. callista | | | | | | 25 | 10 | | | | | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 8 | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| ?Cytoplea sp. | 10 | 76.6 | 33.3 | 3.3 | | 40 | 35 | 5 | 5 | 55 | 35 | 30 | | | 30 | 75 | 85 | 35 | | |
| Micelio estéril GRN | | 23.3 | 10 | | | 5 | 40 | 20 | 5 | 5 | 35 | 10 | 10 | | | 10 | 10 | 5 | | |
| Sphaeropsidal 9 | | | | | | 5 | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| Periconia sp. | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| C. herbarum | | | | | | | 5 | 5 | | | | | | | | | | | | |
| Z. eucalypti | 3.3 | 30 | 56.6 | 10 | | | 15 | 5 | 5 | | | | | | | | | | | |
| Phoma sp. PH2 | | | | | | | | | 5 | | 5 | | | | | | | | | |
| C. gloeoporioides | | | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 4 | | | | | | | | | 5 | 15 | | | | | | | | | | |
| Leptosphaeria sp. | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | |
| Phoma sp. PH 3 | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 7 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 6 | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | |
| Arthrinium sp. | | | | | | | | | | 5 | | | | | | | | | | |
| Pleospora sp. | | | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | |

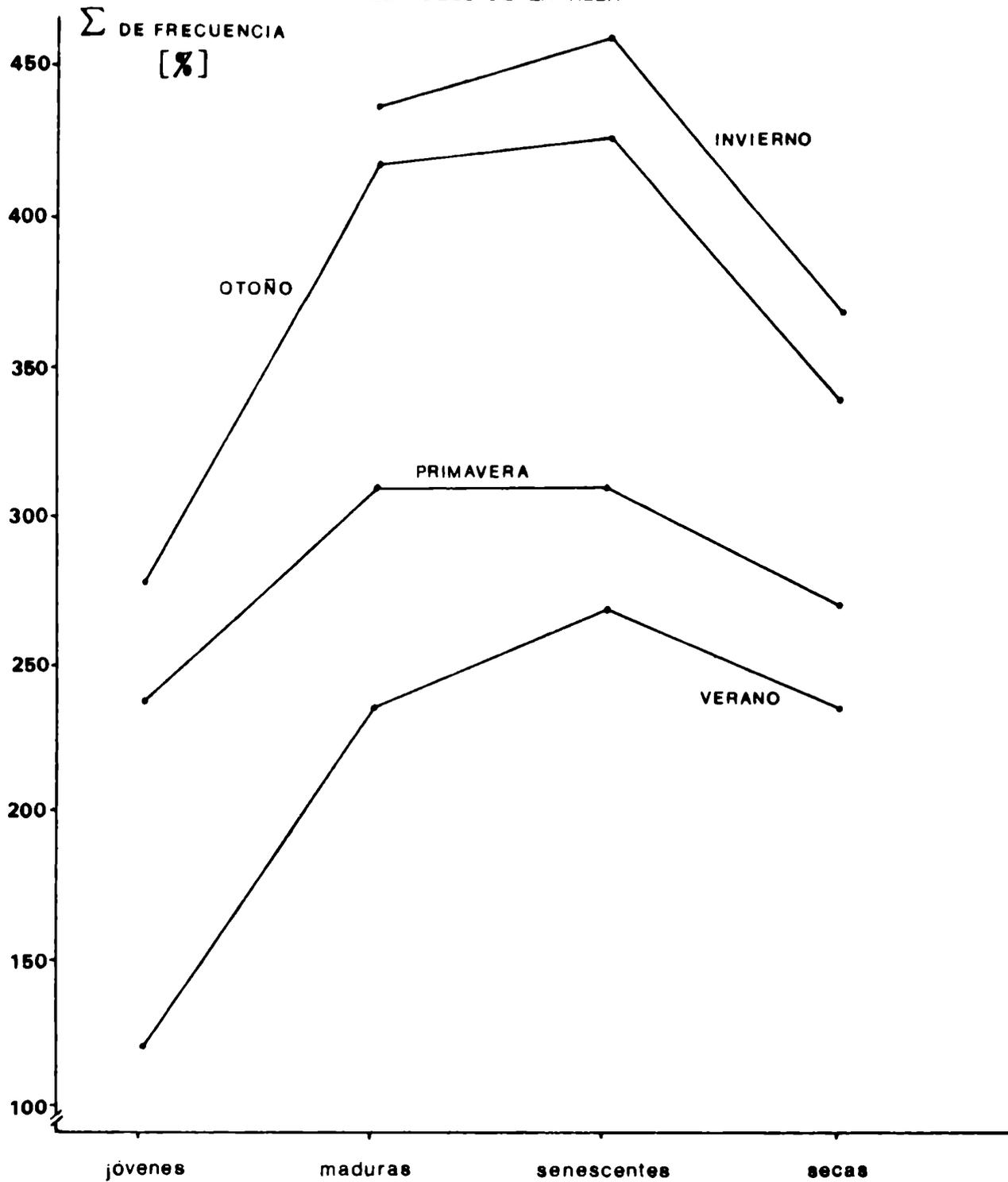
TABLA IV (cont.)

| Estación | Otoño | | | | Invierno | | | | Primavera | | | | Verano | | | |
|---------------------|-------|------|------|------|----------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| | J | M | Sn | Sc | J | M | Sn | Sc | J | M | Sn | Sc | J | M | Sn | Sc |
| Estadíos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| Especies | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sphaeropsidal 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 5 |
| Sordaria sp. | | | | | | | | | | | | | | | | 5 |
| D. dematioideae | | | 3.3 | | | | | | | | | | | | | |
| A. pullulans | | 3.3 | | | | | | | | | 5 | | | | | |
| Pseudoseptoria sp. | | | | 3.3 | | | | | | | | | | | | |
| Chrysosporium sp. | | | | | | | | | | 5 | | | | | | |
| Nectriaceae | | | | | | | | | | | 15 | | | | | |
| Sphaeropsidal 2 | | | | | | | | | 5 | 5 | | | | | | 5 |
| Total de especies | 10 | 14 | 16 | 16 | 16 | 14 | 14 | 14 | 14 | 11 | 14 | 5 | 8 | 11 | 16 | |
| Total de frecuencia | 2764 | 4161 | 4194 | 3393 | 435 | 460 | 370 | 235 | 310 | 310 | 270 | 120 | 235 | 270 | 235 | 235 |

* Esta tabla se confeccionó combinando las tablas I y II. Para cada especie en cada censo, se eligió la frecuencia más alta obtenida en una de las dos técnicas de aislamiento.

FIGURA X

SUMA DE FRECUENCIAS DEL NUMERO TOTAL DE ESPECIES EN FUNCION DE LOS ESTADIOS DE LA HOJA*



* Los datos fueron extraídos de la tabla IV

ma independiente (figuras VIII y IX). Sin embargo, la disminución que se observa en las hojas secas no concuerda. Si analizamos la tabla II, observamos que las especies epifilas colonizan el interior de la hoja cuando ésta se seca. Este aumento de la frecuencia de organismos típicamente epifilos en el interior de la hoja, produce una brusca disminución de la frecuencia de las especies endofilas propiamente dichas. Esto da como resultado un aumento de frecuencia en el interior de la hoja seca. No obstante, como se trata de las mismas especies que actúan como epifilas, la frecuencia en la filosfera disminuye al disminuir la frecuencia de las especies endofilas.

1.4.1. Análisis de los datos por métodos estadísticos

A efectos de obtener conclusiones más objetivas de los datos analizados precedentemente, se aplicaron a ellos dos métodos estadísticos. Un método de clasificación aglomerativo: W.P.G.M. (weighted pair-group method), método de los pares pesados, y un método de ordenamiento multivariado: Análisis Factorial de Correspondencia (AN.FA.CO.).

Análisis de los datos por el W.P.G.M.

A partir de la matriz básica de datos (tabla IV, ver punto 1.4.), se calcularon los valores numéricos que representan el grado de similitud entre pares de censos o estados de la hoja. Se utilizó el "coeficiente de similitud cuantitativo de Czekanowski (1913)":

$$IS = \frac{2w}{a+b}$$

w : suma del valor más bajo (de frecuencia) de las especies comunes a los dos censos.

a : sumatoria de todos los valores del atributo cuantitativo (frecuencia) en el primer censo.

b : sumatoria de todos los valores del atributo cuantitativo (frecuencia) en el segundo censo.

Los resultados se volcaron sobre la matriz de coeficientes de la figura XI a, y se agruparon por el método de clasificación aglomerativo W.P.G.M. (Sokal & Sneath, 1963). El método fué implementado en forma manual sobre las matrices de coeficientes de similitud de la figura XI b-h. El dendrograma resultante se observa en la figura XII.

El análisis del dendrograma nos indica que, a pesar de que los censos no difieren demasiado entre sí, se distinguen dos grupos que se correlacionan con las estaciones del año, y que no hay asociación entre los censos pertenecientes a los mismos estadíos de la hoja.

Uno de los grupos está formado por los censos 1-2-3-4-5-6-7 y 11, que corresponden a las estaciones otoño-invierno. El otro grupo, formado por los censos 10-13-14-15-9, que corresponden al verano y primavera. En el primer grupo es más evidente la asociación entre censos correspondientes a una misma estación del año, que en el segundo grupo.

El censo 11, correspondiente a las hojas secas de primavera, aparece asociado, aunque con el menor coeficiente de similitud, con el primer grupo, correspondiente a los censos de otoño-invierno. Esto puede estar relacionado con la frecuencia de C. clado孢子oides, que es mayor en los censos de primavera-verano, y a que posee especies exclusivas de los censos del primer grupo: Fusarium sp., C. lunata, Phoma sp. PHLK y A. pullulans var. melanigerum.

Los censos 12 y 8, correspondientes a las hojas jóvenes de verano y primavera, se encuentran segregados de los dos grupos antes señalados. Las hojas jóvenes, difieren de los restantes estadíos, debido al menor número de especies que las colonizan, y a la menor frecuencia de las especies que son comunes a todos los censos. La excepción la constituye el censo 1 (hojas jóvenes de otoño), que se une

Uniones

1U4 = 85.34

2U3 = 78.94

13U14 = 79.20

5U6 = 80.44

| | | | |
|------|------|------|------|
| 7590 | 3309 | 6883 | 6753 |
| | 2644 | 6617 | 6470 |
| | | 4220 | 3119 |

FIGURA XI (cont.)

d

| | | | | | | | | | |
|-----|-----------|------|------|------|------|------|-------|------|-----------|
| 1-4 | 2-3-5-6-7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13-14 | 15 | |
| | 6725 | 2788 | 6141 | 4770 | 6415 | 3126 | 3672 | 5031 | 1-4 |
| | | 3405 | 6675 | 6035 | 6006 | 3333 | 5465 | 5343 | 2-3-5-6-7 |
| | | | 4220 | 3119 | 2884 | 3943 | 3583 | 3404 | 8 |
| | | | | 6129 | 6050 | 4418 | 5499 | 6605 | 9 |
| | | | | | 5210 | 4651 | 6405 | 5871 | 10 |
| | | | | | | 3950 | 4263 | 5576 | 11 |
| | | | | | | | 4689 | 5070 | 12 |
| | | | | | | | | 6436 | 13-14 |
| | | | | | | | | | 15 |

Uniones
 $(1-4)U(5-6-7-2-3) = 67.25$
 $(13-14)U10 = 64.05$

e

| | | | | | | | |
|---------------|------|------|----------|------|------|------|---------------|
| 1-4-2-3-5-6-7 | 8 | 9 | 13-14-10 | 11 | 12 | 15 | |
| | 3096 | 6408 | 4985 | 6210 | 3229 | 5187 | 1-4-2-3-5-6-7 |
| | | 4220 | 3351 | 2884 | 3943 | 3404 | 8 |
| | | | 5814 | 6050 | 4418 | 6605 | 9 |
| | | | | 4736 | 4670 | 6153 | 13-14-10 |
| | | | | | 3950 | 5576 | 11 |
| | | | | | | 5070 | 12 |
| | | | | | | | 15 |

Uniones
 $9U15 = 66.05$

FIGURA XI (cont.)

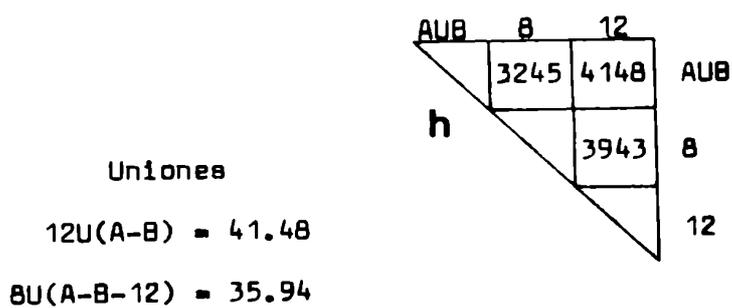
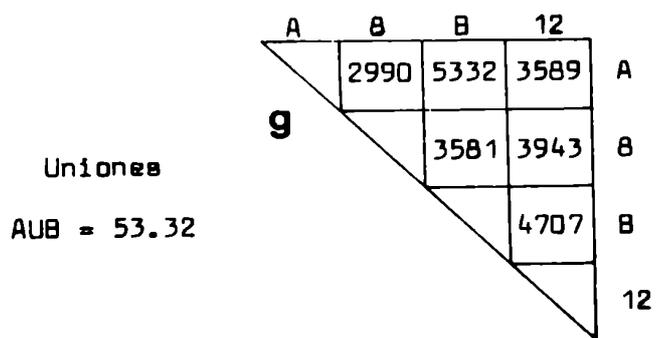
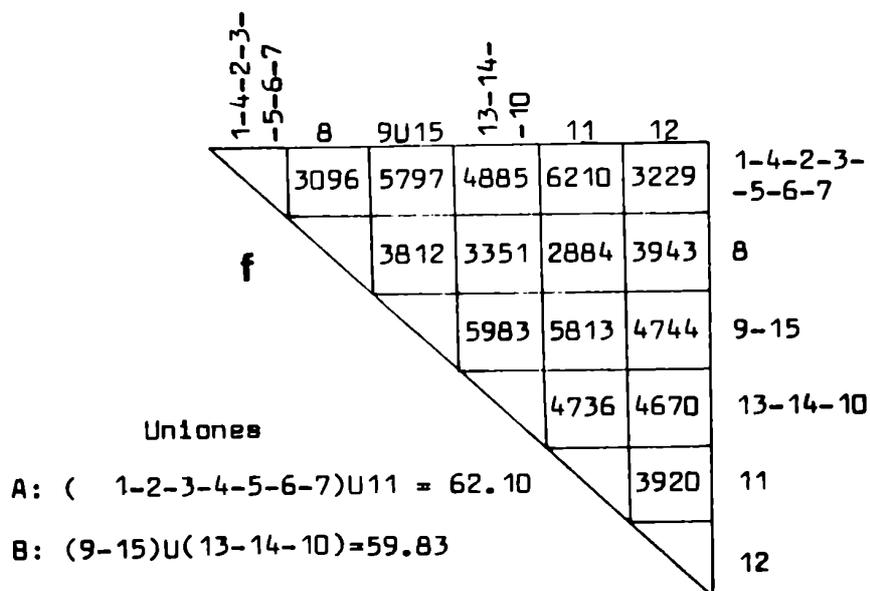
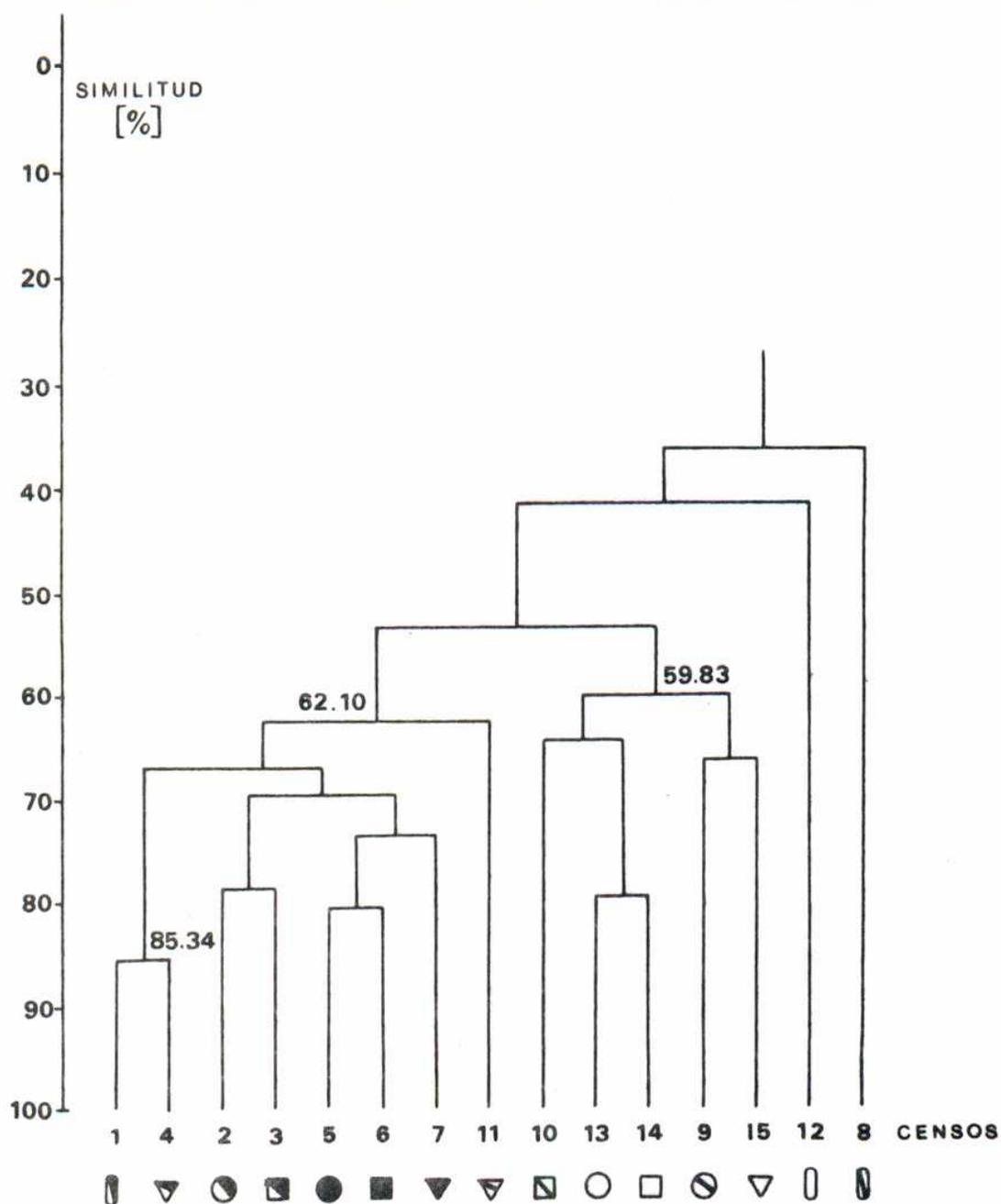


FIGURA XII

DENDROGRAMA PRODUCIDO POR EL W.P.G.M., DONDE SE ANALIZAN LOS COEFICIENTES DE SIMILITUD ENTRE LOS 15 CENSOS DE LA TABLA IV



Referencias: figura XIII, pág. 104.

con un porcentaje de similitud del 85.34 con el censo 4 (hojas secas de otoño). Esto se explica si pensamos que en la plantación de E. viminalis analizada, el desarrollo de hojas nuevas comienza en primavera, continúa en verano, disminuye en otoño y desaparece en invierno o a fines de otoño. El muestreo fué realizado a fines de otoño, en el momento en que ya no se desarrollaban hojas nuevas. Por lo tanto, las hojas que consideramos jóvenes en el censo de otoño, están más cerca en edad a las maduras que a las jóvenes de primavera y verano. Por otra parte, al ser el otoño una época favorable para las especies más frecuentes y, probablemente en la que producen mayor cantidad de propágulos, las hojas jóvenes son colonizadas más rápidamente después de su desarrollo.

Análisis de los datos por AN.FA.CO.

El método de análisis factorial de correspondencia (Cordier, 1965; Benzecri, 1976) ha sido utilizado, con relativa frecuencia en los últimos años, en el estudio de datos fitoecológicos (Lacoste & Roux, 1971; Romane, 1972; Batlikova et al., 1976; Collantes & Lewis, 1980; Britton & Podlejski, 1981). Este tipo de datos también puede ser tratado por análisis de componentes principales, sin embargo el AN.FA.CO. tiene la ventaja de tomar en cuenta el carácter probabilístico de los datos y, la simetría existente entre líneas y columnas de la tabla (Lebart & Fenelon, 1971; Romane, 1972).

Los datos analizados son, como en el caso anterior, los de la tabla o matriz IV. Los porcentajes de varianza extraídos por los primeros cinco ejes, y la suma total, es la siguiente:

| ejes | I | II | III | IV | V | Total |
|----------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| varianza | 27.320 | 16.887 | 11.690 | 10.204 | 8.384 | 74.486 |

En la figura XIII se grafica la distribución de los censos o variables según los resultados del AN.FA.CO., para los ejes I y II. Se observa un ordenamiento definido por el eje II. Se distinguen tres grupos, uno en los valores positivos del eje, con mayor proporción de los censos de otoño; otro desplazado hacia los valores negativos, con mayor proporción de censos de verano; y un tercero, intermedio entre los otros dos, en los valores absolutos más bajos del eje II. Este último con mayor proporción de los censos de invierno, aunque más heterogéneo, ya que incluye censos de otoño y primavera.

Los censos de primavera no se segregaron independientemente, y se encuentran relacionados con los tres grupos anteriores, con excepción del censo 8, correspondiente al estadio de hojas jóvenes de primavera, que se desplaza hacia los valores negativos más altos del eje I.

A pesar de la heterogeneidad de los censos de primavera, no hay duda que este gradiente está correlacionado con las estaciones del año.

La interpretación de este método debe hacerse teniendo en cuenta una propiedad importante: "una especie está más próxima a un estado de variable (censo o estadio de la hoja en las diferentes estaciones del año), cuanto más fuertemente intervenga en el perfil de esa especie" (Romane, 1972).

Los censos de primavera no se segregan independientemente del resto, debido a que cada estadio tiene características comunes con alguno de los tres grupos formados. El censo 11 se segrega con los censos de otoño, debido a las especies que tienen en común : PSE*, POH, CUR, AUR, y comparten alta frecuencia de ASC. El censo 9 se une a los censos de invierno, probablemente porque comparten una frecuencia similar de GRN. El censo 10, aparece junto a los censos de verano, probablemente porque comparten baja frecuencia de CLA y tienen

* Para el significado de las siglas, véase las referencias de la figura XIII.

a CHR como especie común y exclusiva de los censos 10 y 13. El censo 8, correspondiente a hojas jóvenes de primavera, se encuentra tan desplazado hacia los valores negativos del eje I, y no participa de ningún grupo, por el alto número de especies exclusivas: PLE, ART, SFH, SGH, PCH, y LEP, así como por la alta frecuencia de MIC.

El grupo formado por los censos de otoño es el más homogéneo, y se caracteriza por la alta frecuencia de CLA, y por sus especies exclusivas: ZOE, FUS, PSE y SEP. Las especies PSI, POH, CUR, AUR y ASC, las comparte únicamente con el censo 11, correspondiente a las hojas secas de primavera.

El grupo que forman los censos de verano, se caracteriza por las bajas frecuencias de CLA, y EPC, y por las especies exclusivas: CLL, CHR, SOR, y SAH.

Los censos de invierno que forman el tercer grupo, tienen porcentajes de frecuencia de especies intermedios entre los censos de verano e invierno, en especial en cuanto a las especies más frecuentes y distribuidas: CLA y ALT, y por la presencia de PFF, MYC, PRR y CHE como especies exclusivas.

El censo número 2 de otoño se encuentra incluido junto a los censos de invierno, debido a que probablemente ha sido "arrastrado" hacia los valores negativos del eje, por su semejanza con los relevamientos de verano.

2. Métodos de observación directa

2.1. Análisis de la densidad fúngica con M.E.B.

En la tabla V se presentan los valores de densidad de micelio epifilo, en los diferentes estadios de la hoja y en las cuatro estaciones del año, medidos mediante fotografías con M.E.B. La densidad está expresada en mm de micelio por mm² de hoja. En la lámina II se presentan algunas de las fotografías obtenidas.

FIGURA XIII

ORDENAMIENTO DE LOS RELEVAMIENTOS (CENSOS) Y ESPECIES SEGUN LOS EJES I Y II, POR MEDIO DE AN. FA. CO

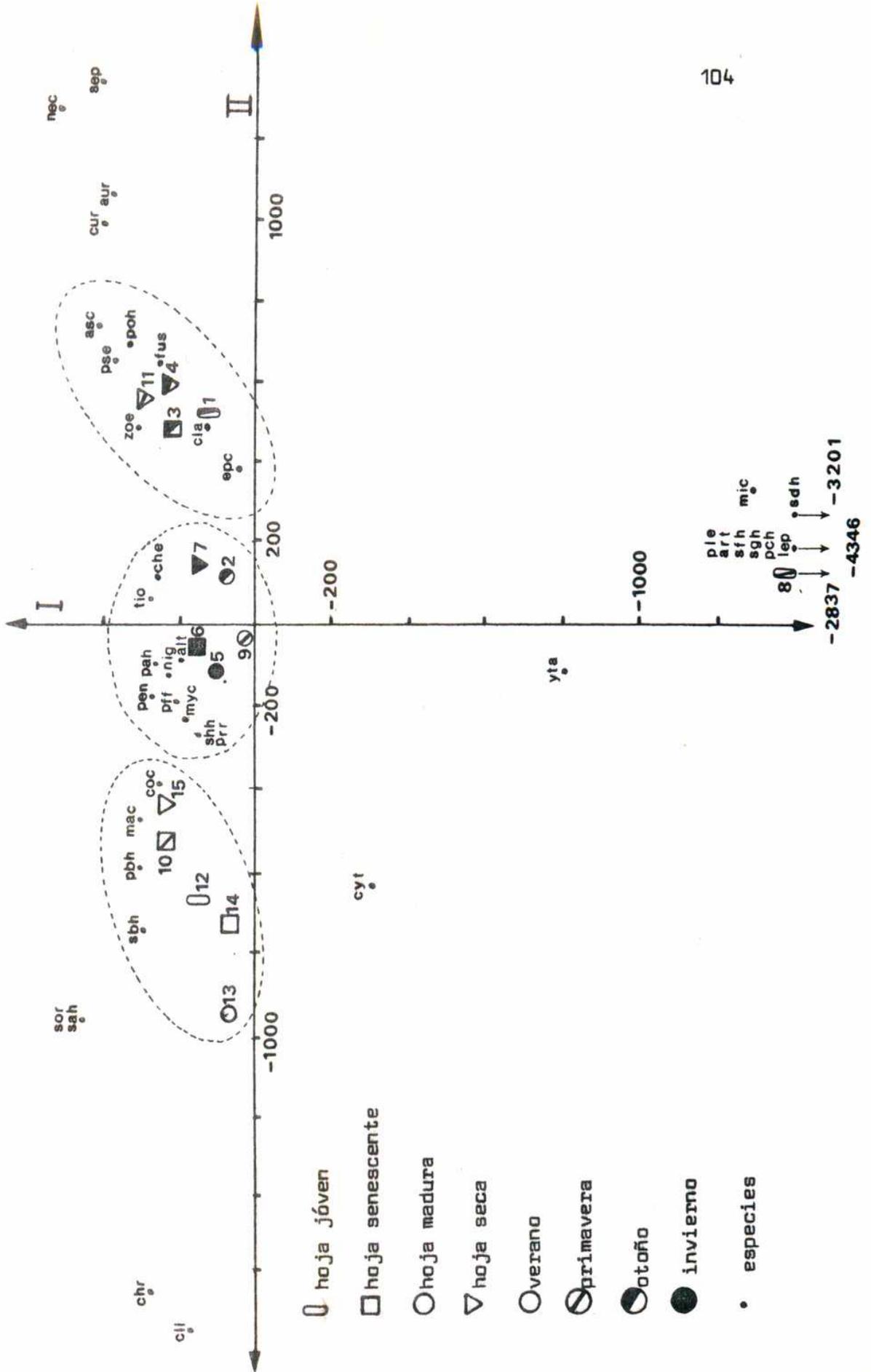


FIGURA XIII (cont.)

REF.: SIGLA DE LAS ESPECIES CONSIDERADAS EN EL GRAFICO DE LA FIGURA XIII

| | |
|---|---------------------------------|
| ALT : <u>A. alternata</u> | SBH : Sphaeropsidal 2 |
| ART : <u>Arthrinium</u> sp. | SDH : Sphaeropsidal 4 |
| ASC : Acomycete 1 | SEP : <u>Pseudoseptoria</u> sp. |
| AUR : <u>A. pullulans</u> var. <u>melanigerum</u> | SFH : Sphaeropsidal 6 |
| CHE : <u>C. herbarum</u> | SGH : Sphaeropsidal 7 |
| CHR : <u>Chrysosporium</u> sp. | SHH : Sphaeropsidal 8 |
| CLA : <u>C. cladosporioides</u> | SOR : <u>Sordaria</u> sp. |
| CLL : <u>C. gloeosporioides</u> | TIO : <u>P. oxyanthi</u> |
| COC : <u>C. martiniae</u> | YTA : <u>Ascochyta</u> sp. |
| CUR : <u>C. lunata</u> | ZOE : <u>Z. eucalypti</u> |
| CYT : ? <u>Cytoplea</u> sp. | |
| DRE : <u>Drechalera</u> sp. | |
| EPC : <u>E. purpurascens</u> | |
| FUS : <u>Fusarium</u> sp. | |
| GRN : Micelio estéril GRN | |
| LEP : <u>Leptosphaeria</u> sp | |
| MAC : <u>M. smilacina</u> | |
| MIC : <u>M. callista</u> | |
| MYC : <u>Mycosphaerella</u> sp. | |
| NEC : Nectriaceae | |
| NIG : <u>N. oryzae</u> | |
| PAH : <u>Phoma</u> PH 1 | |
| PBH : <u>Phoma</u> PH 2 | |
| PEN : <u>Penicillium</u> sp. | |
| PFF : Sphaeropsidal 9 | |
| PLE : <u>Pleospora</u> sp. | |
| POH : <u>Phoma</u> PHLK | |
| PRR : <u>Periconia</u> sp. | |
| PSE : <u>Pseudodiplodia</u> sp. | |
| SAH : Sphaeropsidal 1 | |

Los datos de hojas maduras, senescentes y secas, fueron tratados por análisis de varianza*. No se incluyeron los datos de hojas jóvenes que, al presentar en su mayoría valores nulos de densidad, interfieren en el método estadístico. Se aplicó la transformación $y = x + 0.5$. Los factores interactúan, por lo tanto sólo se han podido estimar los efectos principales, edad de la hoja y estación del año. Ambos resultaron muy significativos. El cuadrado medio del error es muy pequeño, 0.1117 con 110 grados de libertad. Los F calculados fueron los siguientes:

$$\text{Edad} = F(2, 110) : 69.13$$

$$\text{Estación} = F(3, 110) : 91.77$$

En la figura IVX están representadas las medias de los valores de la tabla V. Observamos que la densidad tiende a aumentar desde un mínimo en las hojas jóvenes, hasta un máximo en las senescentes. Este aumento con la edad de la hoja concuerda con los datos de frecuencia obtenidos para las especies epífilas de mayores frecuencias (figura VII). En las hojas secas, sin embargo, aumenta en invierno y otoño, pero se mantiene constante en verano y disminuye en primavera. Como en los datos de frecuencia, la densidad es máxima en todos los estados de las hojas en invierno.

En el primer muestreo no se observó diferencias de densidad entre la cara adaxial y abaxial de las hojas, por esa razón los resultados se presentan sin discriminar. Esta semejanza en la densidad de micelio en las dos caras, discrepa con los resultados obtenidos en otras especies vegetales (Pugh & Buckley, 1971a; Breeze & Dix, 1981). Podemos explicar estos resultados si examinamos las fotografías de la lámina II, donde no se observan diferencias anatómicas entre las dos caras. La diferencia de estructuras superficiales entre las dos caras es uno de los factores que incide sobre la densidad de organismos en el filoplano (Last & Warren, 1972; Dickinson, 1976;

* Este análisis fue realizado en el C.E.V.E.G. (Centro de Ecofisiología Vegetal), CONICET, por el Ing. Agr. Hector D. Ginzo.

TABLA V

DENSIDAD DE MICELIO FUNGICO EN EL FILOPLANO DE E. VIMINALIS. LOS VALORES SE EXPRESAN EN mm DE HIFA POR mm² DE HOJA, Y SE OBTUVIERON POR MEDIO DE FOTOGRAFÍAS CON M.E.B.

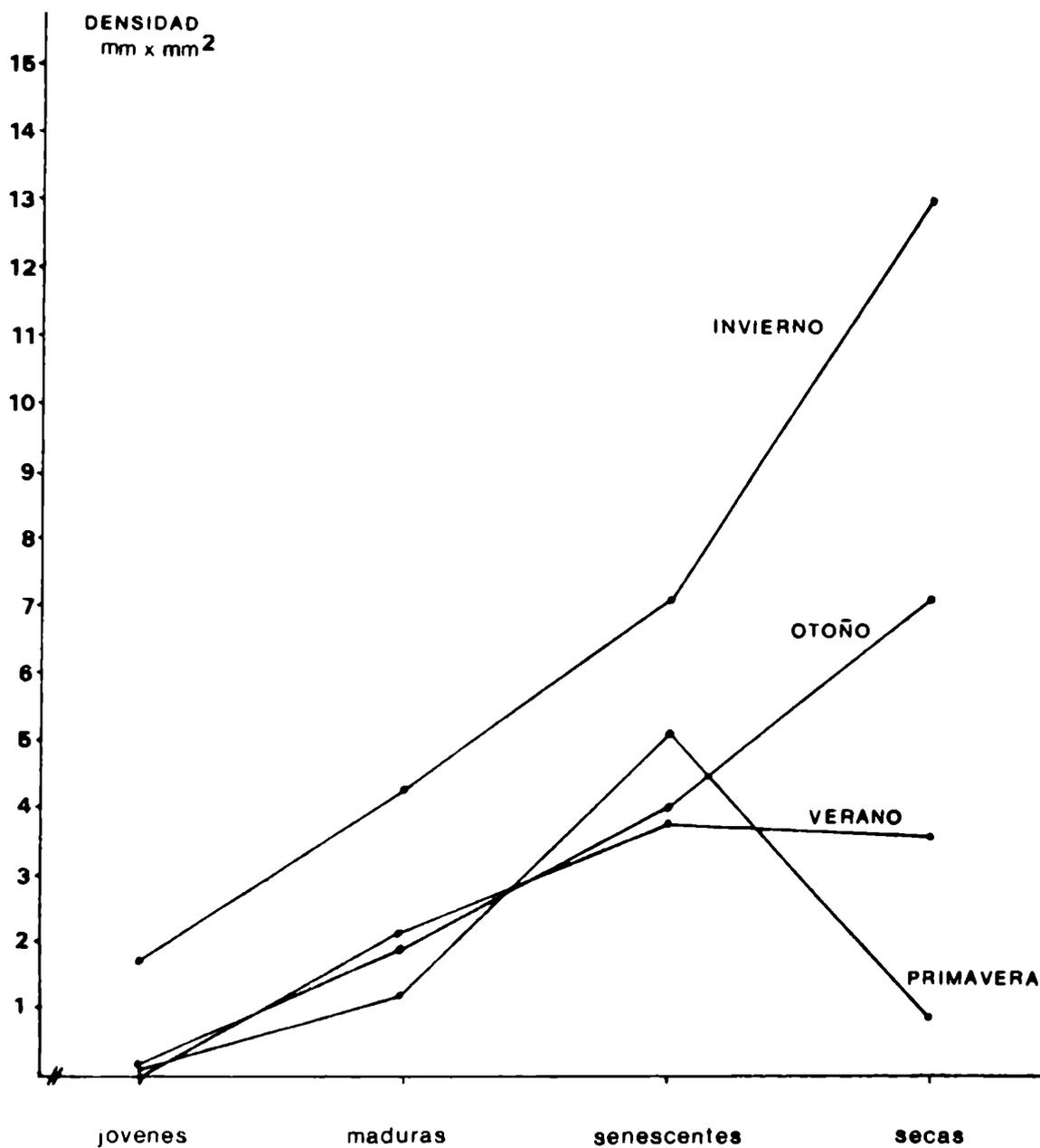
| Estación Hoja | Invierno | Primavera | Verano | Otoño |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Jóven | 4.80 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 6.00 | 1.56 | 0.00 | 0.00 |
| | 1.32 | 0.00 | 0.00 | 1.20 |
| | 3.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 2.28 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | \bar{X} : 1.75 | \bar{X} : 0.16 | \bar{X} : 0.00 | \bar{X} : 0.29 |
| Madura | 5.04 | 0.00 | 3.36 | 8.52 |
| | 5.04 | 2.20 | 4.80 | 1.80 |
| | 8.28 | 0.48 | 1.20 | 2.52 |
| | 3.72 | 0.00 | 3.00 | 1.68 |
| | 5.04 | 5.64 | 0.00 | 0.96 |
| | 2.88 | 2.64 | 0.00 | 3.00 |
| | 4.44 | 0.00 | 2.28 | 2.28 |
| | 3.72 | 2.40 | 3.96 | 0.72 |
| | 2.88 | 0.00 | 1.20 | 2.40 |
| | 3.82 | 0.36 | 5.40 | 0.00 |
| | 3.48 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 0.84 | 0.84 | 0.00 | 0.00 | |
| | \bar{X} : 4.39 | \bar{X} : 1.23 | \bar{X} : 2.1 | \bar{X} : 1.99 |
| Senescente | 4.92 | 9.36 | 1.92 | 5.88 |
| | 1.80 | 7.56 | 2.28 | 6.84 |
| | 3.96 | 8.05 | 0.00 | 2.76 |
| | 13.33 | 5.64 | 0.00 | 4.56 |
| | 13.33 | 4.92 | 2.64 | 2.52 |
| | 10.69 | 3.96 | 3.36 | 7.80 |
| | 9.12 | 0.60 | 3.12 | 1.32 |

TABLA V (cont.)

| | | | | | |
|-------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Senescentes | 6.12 | 6.96 | 2.40 | 5.16 | |
| | | 2.04 | 7.80 | 2.88 | |
| | | 5.04 | 1.80 | 1.92 | |
| | | 3.84 | 6.48 | 4.92 | |
| | | 3.24 | 14.65 | 1.80 | |
| | $\bar{X}: 7.03$ | $\bar{X}: 5.10$ | $\bar{X}: 3.87$ | $\bar{X}: 4.03$ | |
| Secas | 15.60 | 0.00 | 6.00 | 21.73 | |
| | 12.49 | 0.00 | 5.40 | 3.00 | |
| | 9.85 | 0.84 | 7.20 | 6.84 | |
| | 11.53 | 0.00 | 7.56 | 5.64 | |
| | 16.81 | 0.00 | 0.00 | 5.40 | |
| | 14.29 | 1.20 | 0.96 | 5.64 | |
| | 8.88 | 0.72 | 1.92 | 5.16 | |
| | 14.77 | 1.32 | 1.44 | 4.80 | |
| | | 0.12 | 0.00 | 2.76 | |
| | | 2.88 | 0.00 | 5.64 | |
| | | 2.88 | 3.60 | 12.25 | |
| | | | 9.97 | | |
| | | $\bar{X}: 13.02$ | $\bar{X}: 0.91$ | $\bar{X}: 3.67$ | $\bar{X}: 7.17$ |

FIGURA IVX

REPRESENTACION GRAFICA DE LOS VALORES MEDIOS DE DENSIDAD FUNGICA EN EL FILOPLANO DE E.VIMINALIS, MEDIDOS POR MEDIO DE FOTOGRAFIAS CON M.E.B.



Baker et al., 1979). Por otra parte, la posición de la hoja sobre la planta es lateral en lugar de dorsiventral, y por lo tanto no difieren en cuanto a la incidencia de los factores climáticos.

La distribución del micelio sobre las hojas también muestra diferencias con lo observado sobre otros vegetales. Pesante (1963), Friend (1965), Dickinson (1967), y Pugh & Buckley (1971a), señalan que la mayor concentración de epífilos se encuentra sobre las nervaduras principales de la hoja. En E. viminalis el micelio está ausente sobre las nervaduras, y se encuentra localizado en las áreas entre nervaduras (lámina IIId), muchas veces concentrado en la depresión que existe en el borde de los estomas (lámina IIc), como ya lo señalaran Baker et al. (1979).

2.2. Observación de fructificaciones sobre el sustrato

En la tabla VI se han señalado los resultados de la observación de fructificaciones sobre hojas en el árbol y hojarasca, en las cuatro estaciones del año. La mayor parte de los organismos corresponden a especies endofilas registradas por las técnicas de aislamiento. Harknessia eucalypti es la única especie no registrada por dichas técnicas. Sin embargo apareció con mucha frecuencia sobre hojas maduras, senescentes, secas y hojarasca, en todas las estaciones del año. A partir de sus fructificaciones se realizaron cultivos que fueron comparados con los de cepas estériles obtenidas por los métodos de aislamiento. No obstante, ninguna de esas cepas correspondió a las características de H. eucalypti en cultivo. Esta especie, por otra parte, fructifica fácilmente en medios de cultivo semi-sintéticos. Debemos recordar que, como se señaló anteriormente, las técnicas de aislamiento y observación directa, se realizaron con un año de diferencia. Las condiciones de humedad relativa y temperatura mensuales en los dos períodos no fué demasiado diferente; sin embargo, éstas y otras variaciones climáticas y del hospedante, que no se han re-

gistrado en este estudio, pueden ser la causa de la aparición de H. eucalypti en el segundo período de muestreo. En estos momentos se está realizando una nueva etapa en el estudio de los endofilos de E. viminalis, que nos permite corroborar comportamientos similares en otras especies fúngicas. La micoflora básica no sufre variaciones significativas en los muestreos de años sucesivos, pero ciertas especies esporádicas aumentan significativamente su frecuencia en algunos muestreos, y aún aparecen con frecuencias relativamente altas, especies que nunca fueron registradas con anterioridad. Las causas de estas variaciones sólo podrán ponerse en evidencia si se realizan estudios que se prolonguen durante varios años sucesivos, y se registren parámetros microclimáticos y condiciones del hospedante.

Las fructificaciones de C. martiniae fueron observadas únicamente en invierno y otoño, del mismo modo que las de Z. eucalypti. Sin embargo Cytoplea sp. fué encontrada fértil en primavera, verano y otoño. Estas observaciones coinciden con las de distribución de frecuencias registradas por las técnicas de aislamiento.

TABLA VI

OBSERVACION DE FRUCTIFICACIONES SOBRE HOJAS DE E. VIMINALIS

| Estación | Invierno | | | | | Primavera | | | | | Verano | | | | | Otoño | | | | | |
|---------------------|----------|---|----|----|------|-----------|---|----|----|------|--------|---|----|----|------|-------|---|----|----|------|---|
| | J | M | Sn | Sc | Hoj. | J | M | Sn | Sc | Hoj. | J | M | Sn | Sc | Hoj. | J | M | Sn | Sc | Hoj. | |
| Estadío Especies | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C. martinae | | | + | + | + | | | | | | | | | | | | | | | + | |
| Z. eucaalypti | | | | + | + | | | | | + | | | | | | | | | | + | + |
| P. oxyanthi | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ascomycete 1 | | | | + | + | | | | + | | | | | | | | | + | | | + |
| H. eucaalypti | | | + | + | | | + | | + | | | | | | + | | | + | | + | |
| M. emilacina | | | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ?Cytoplea sp. | | | | | | | | | | | | | | + | + | | + | | | + | |
| Nectriaceae | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| Phoma sp. PH 2? | | | | | | | | | | + | | | | | | | | | | | |

CONCLUSIONES Y DISCUSION

La comunidad de la filosfera de E. viminalis sufre cambios estacionales más marcados que los producidos por la edad y estado fisiológico de la hoja. Ambas variaciones involucran principalmente cambios cuantitativos y, en menor grado, cualitativos. Esta última característica de las poblaciones fúngicas de la filosfera ya han sido observadas por Gourbier (1975, 1976), en Abies alba ; Latch & Mc Kenzie (1977), en Lolium spp. y Mishra & Dickinson (1981) en hojas de Ilex aquifolia. El invierno y otoño son las estaciones más favorables para el desarrollo fúngico en este habitat. El verano, la más desfavorable, observándose una reducción tanto cuantitativa como en el número de especies presentes. El invierno y otoño son también las dos estaciones donde fructifica la mayor parte de los organismos, y lo hacen preferentemente en hojas secas sobre el árbol y en la hojarasca. Es evidente una relación estrecha con los factores climáticos, en especial con la humedad ambiente. Resultados semejantes fueron observados por Last (1955); Breeze & Dix (1981) y Mishra & Dickinson (1981). Sin embargo, otros investigadores señalan al verano como la estación donde se observa mayor abundancia de organismos (Pugh, 1968; Ruscoe, 1971; Latch & Mc Kenzie, 1977). Las variaciones en función de la edad y estado fisiológico de la hoja, señalan un aumento cuantitativo y en menor grado cualitativo de la comunidad a medida que la hoja envejece.

La comunidad fúngica de la filosfera de E. viminalis está compuesta por dos grupos bien definidos de organismos: los que habitan el filoplano y los endofilos. Estos dos grupos funcionan casi independientemente hasta la senescencia y muerte de la hoja sobre la planta. La muerte de los tejidos transforma a la hoja en un sustrato diferente, más homogéneo, como consecuencia de lo cual se verifica un cambio sustancial en las poblaciones fúngicas. En el nuevo equilibrio no suelen intervenir nuevos organismos, sino que se produce

un reordenamiento de los ya existentes. Los epifilos o habitantes del filoplano, penetran en el interior de la hoja, desplazando a los endofilos, aunque, sin que éstos lleguen a desaparecer. En estas condiciones, los endofilos generalmente comienzan a fructificar. A pesar de que en los dos grupos se observan variaciones con el paso de las estaciones del año, las poblaciones endofilas no sufren cambios tan marcados como los observados en las poblaciones epifilas. Es evidente que en el interior de la hoja están más protegidas de las variaciones climáticas, que los habitantes del filoplano (di Menna, 1971). En forma inversa, los organismos endofilos parecen ser los más influenciados por la edad y estado fisiológico de la hoja. Se observa en ellos un aumento de la frecuencia acumulada y número de especies a medida que la hoja envejece. En las especies del filoplano se registraron ciertas diferencias entre los métodos de observación directa y aislamiento, mientras en el primero se evidencia un aumento de la densidad con la edad de la hoja, en el segundo no se registró ningún patrón estable ni regular de la frecuencia ni del número de especies. Las diferencias observadas en los dos métodos, pueden atribuirse a que no fueron realizados simultáneamente. No obstante, las condiciones de temperatura y humedad relativa medias en los dos períodos de muestreo (figuras IV y V), no difieren significativamente. Por lo tanto podemos atribuírlas al estado del hospedante, o a condiciones microclimáticas que no hemos registrado. También debemos tener en cuenta que se trata de parámetros que se comportan en forma diferente. La frecuencia en las hojas jóvenes y maduras en ciertas épocas del año es alta, mientras que la densidad en las mismas estaciones se mantiene baja. El aumento puede ser consecuencia del aporte de especies esporádicas y de baja frecuencia, que forman colonias densas pero limitadas (especies ruderales, Pugh, 1980). Estas producen un aumento de la frecuencia pero no de la densidad, que está más influenciado por las especies de crecimiento intensivo, que en estos estadíos todavía no han colonizado completamente el sustrato.

El grupo de organismos registrados en el filoplano es semejante al encontrado sobre otros vegetales superiores de climas templados (Hudson, 1968). Los elementos comunes son: A. alternata, C. cladosporioides, E. purpureascens y Fusarium sp. Están ausentes, o se registraron con muy baja frecuencia, A. pullulans y B. cinerea, probablemente reemplazados por M. callista y P. oxyanthi. Se observó la presencia de N. oryzae y C. lunata, dos elementos del filoplano de los trópicos (Hudson, 1968). Esto puede estar reflejando ciertas características tropicales en el clima del sitio de muestreo, como señalamos en el punto 1.2.

Si comparamos esta flora con la registrada sobre otras especies de Eucalyptus en Australia, observamos que difiere notablemente de la encontrada sobre E. stellulata (Lamb & Brown, 1976), pero es semejante a la de E. regnans (Macaulay & Thrower, 1966), a pesar de que estos últimos autores no estudiaron específicamente las hojas vivas. Ello parece indicar más una especificidad con el hospedante, que diferencias regionales. Esta cuestión debe ser corroborada con estudios de la misma especie en diferentes regiones y, de diferentes especies en un mismo ambiente.

A diferencia de los organismos del filoplano, los endofitos se caracterizan por especies que no han sido registradas como tales hasta el presente, ni siquiera sobre otras especies del mismo género. Ello puede estar reflejando tanto una alta especificidad como diferencias regionales.

Con base en las clasificaciones propuestas por Leben (1965), Dickinson (1976) y Pugh (1980), realizamos la siguiente clasificación de los organismos no patógenos de la filoesfera, con inclusión de la flora endofita, en función del papel que estos organismos desempeñan en la hoja, el tipo de desarrollo, y la parte del ciclo de vida que cumplen sobre este habitat.

HONGOS EPIFILOS

Exótonos:

son depositados en forma de esporas u otros propágulos sobre la superficie de las hojas vivas, pero nunca llegan a germinar y colonizar ese habitat. En algunos casos puede tratarse de hongos para los cuales el filoplano constituye un eslabón importante de su ciclo de vida, pero éste se completa esencialmente en otro lugar (coprófilos). Están incluidos en este grupo los saprófitos primarios, que no desarrollan sobre la hoja hasta que ésta muere.

Cabe presumir que debido al tipo de técnicas utilizadas, estos organismos no han sido registrados en este estudio.

Ruderales:

se encuentran la mayor parte del tiempo como propágulos inactivos sobre la hoja viva, pero pueden desarrollar cuando se dan ciertas condiciones particulares. Los nutrientes disponibles sobre la superficie de la hoja son suficientes para su desarrollo, pero la alta perturbación del habitat, provocada principalmente por los agentes climáticos, impide su desarrollo. Sin embargo, cuando esa perturbación decrece, estos organismos pueden crecer. Tienen la capacidad de germinar rápidamente, pero son incapaces de crecer en forma extensiva. Forman colonias densas pero limitadas, y generalmente muy esporuladas. En E. viminalis pueden estar representadas por las especies esporádicas de baja frecuencia. En especial aquellas que aparecen sobre hojas jóvenes y maduras de invierno y primavera. En esos estadíos tienen mayores posibilidades de desarrollar debido a la menor competencia con las especies residentes, que se presentan con menor frecuencia. Ej. Pleospora sp., Arthrimum sp., Phoma PH 3, Leptosphaeria sp., Sordaria sp., Periconia sp., Ascochyta sp.

Residentes:

son las especies mejor adaptadas para crecer sobre la hoja viva. Son hongos que crecen en forma continua y extensiva, pero más lentamente que los ruderales. De las especies aisladas de E. viminalis, incluimos en este grupo a: A. alternata, C. cladoeporioides, E. purpurascens y M. callista.

Pueden considerarse específicos, si sólo son registrados en la superficie de las hojas vivas, y no participan activamente en la degradación del sustrato cuando la hoja muere; o inespecíficos si también actúan como saprófitos primarios. Las especies precitadas corresponden a este segundo grupo.

Saprófitos primarios:

son incapaces de crecer hasta la senescencia y muerte de la hoja. Actúan activamente en los primeros estados de la degradación. No fueron registrados en este estudio.

HONGOS ENDOFILOS

Ruderales:

como en el caso de los epifilos, estos organismos se encuentran, la mayor parte del tiempo, como propágulos inactivos en la superficie de la hoja, pudiendo penetrar y desarrollarse en el interior, sólo cuando se registran condiciones particulares en el hospedante y el ambiente. En E. viminalis estarían representados por: Sphaeropsidal 2, Nectriaceae, Pseudoseptoria sp. A. pullulana, Phoma PH 2, Phoma PHLK.

Residentes:

son las especies mejor adaptadas para desarrollarse en el interior de la hoja, Ej. C. martiniae, ?Cytoplea sp. , M. smilacina, Micelio

estéril GRN, y Z. eucalypti.

Debido a que no se ha observado reemplazo de especies en los diferentes estadios de las hojas, no es posible plantear una sucesión de colonización. No obstante, en la figura XV se intenta esquematizar la colonización fúngica en hojas de E. viminalis en la Pcia. de Buenos Aires, en función de los grupos ecológicos planteados anteriormente y la frecuencia relativa de los organismos aislados.

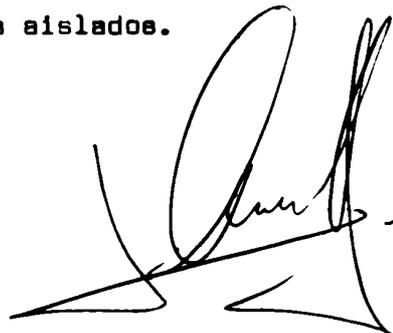
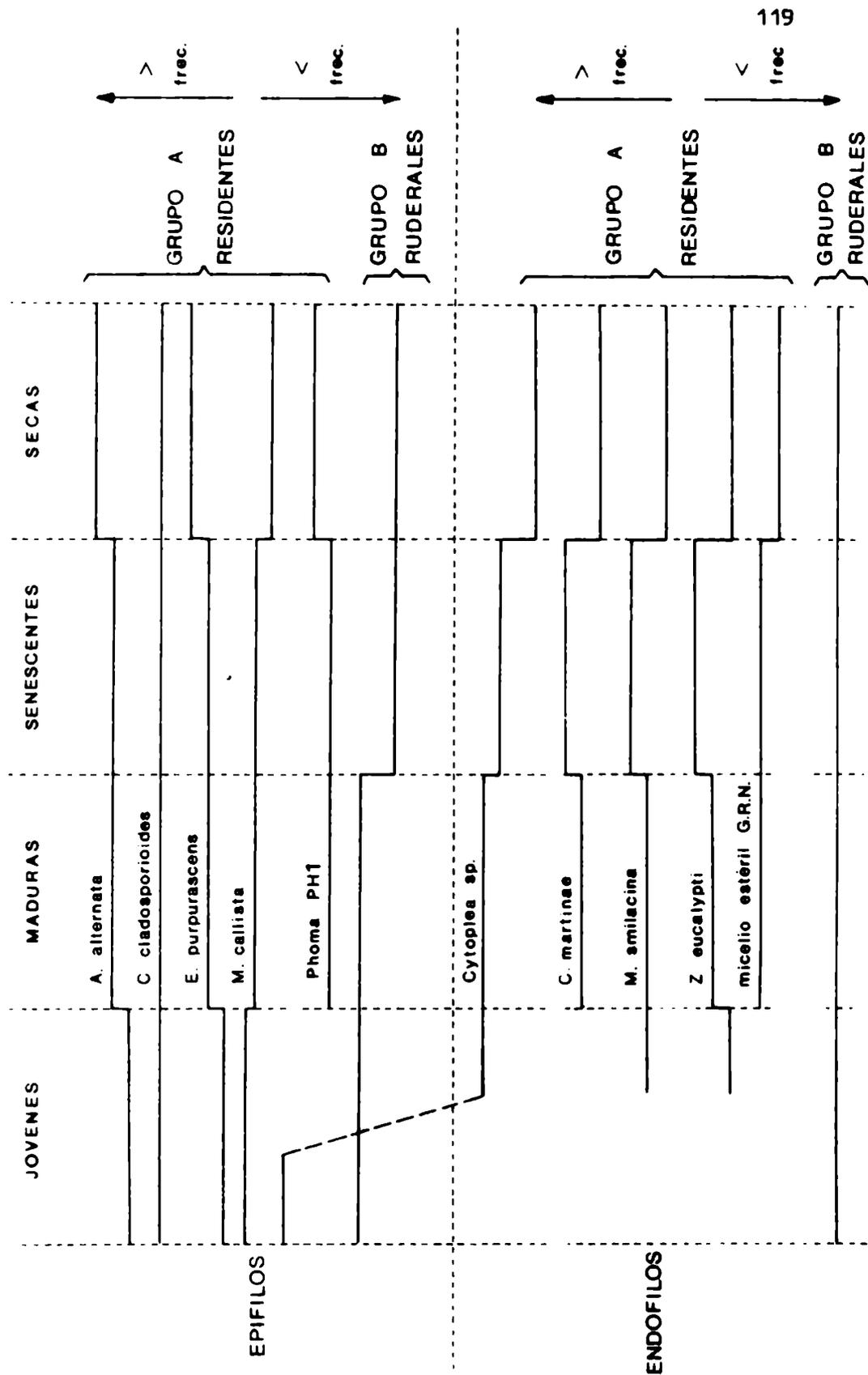


FIGURA XV

COLONIZACION FUNGICA EN HOJAS DE EUCALYPTUS VIMINALIS

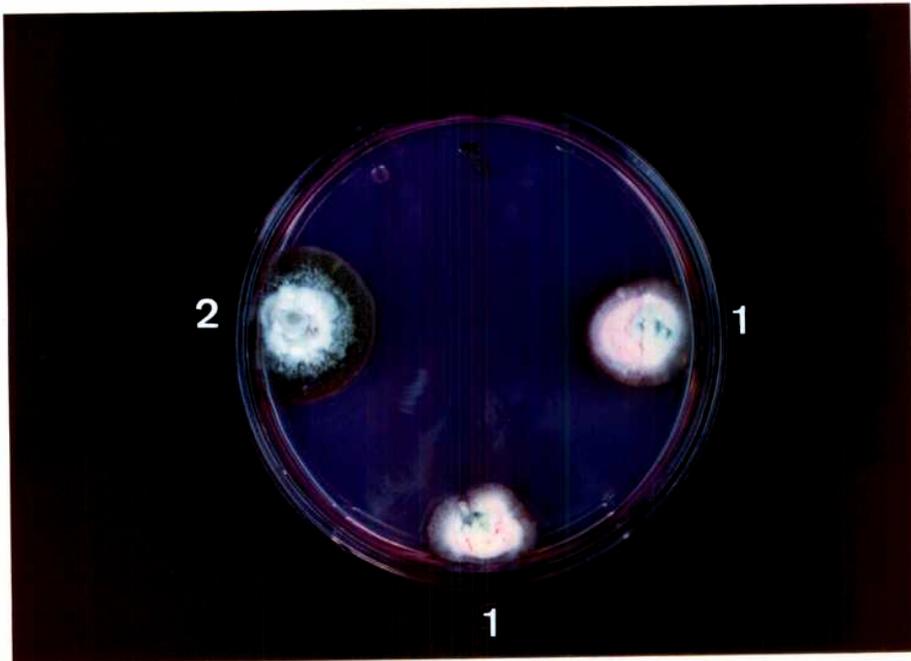
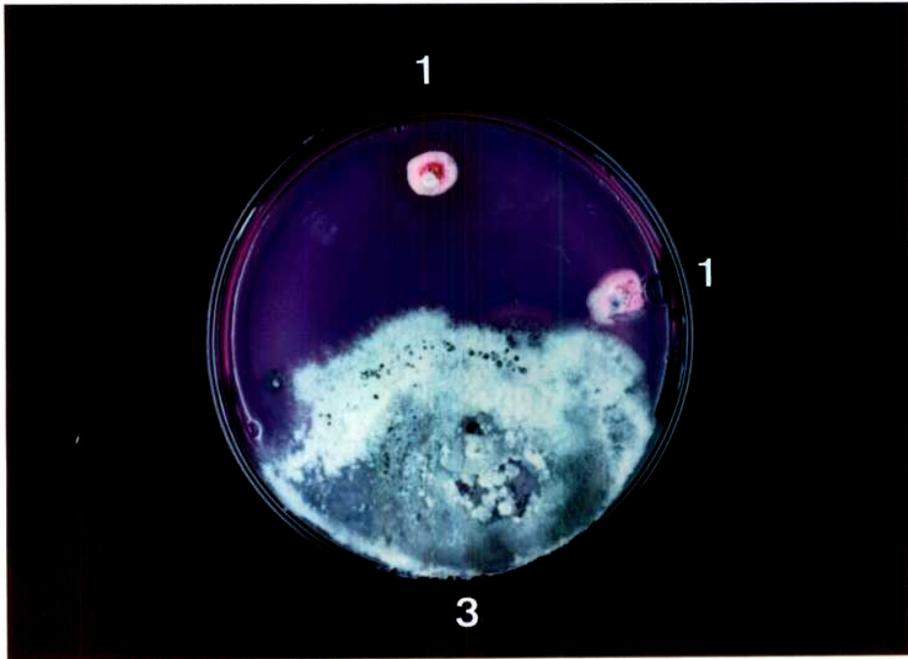


FOTOGRAF IAS

HONGOS AISLADOS A PARTIR DE SUBMUESTRAS DE HOJAS DE EUGALYPTUS VIMINALIS, PREVIA ESTERILIZACION SUPERFICIAL

- 1- Coccomyces martinae
- 2- ?Cytospora sp.
- 3- Macrophoma emilecina

LAMINA I



FOTOGRAFÍAS DE LA SUPERFICIE DE HOJAS DE EUCALYPTUS VIMINALIS CON MEB.

- a- hoja madura, cara adaxial, 1200 X, agosto 1981. Presenta 5.04 mm de hifa por mm² de hoja.
- b- hoja senescente, cara adaxial, 1200 X, agosto 1981. Presenta 4.92 mm de hifa por mm² de hoja.
- c- hoja seca, cara abaxial, 1200 X, agosto 1981. Presenta 16.81 mm de hifa por mm² de hoja. Las hifas se disponen preferentemente en la depresión del estoma.
- d- hoja senescente, cara adaxial sobre vena principal, agosto 1981. No se observan hifas. 1200 X.

LAMINA II



a



b



c

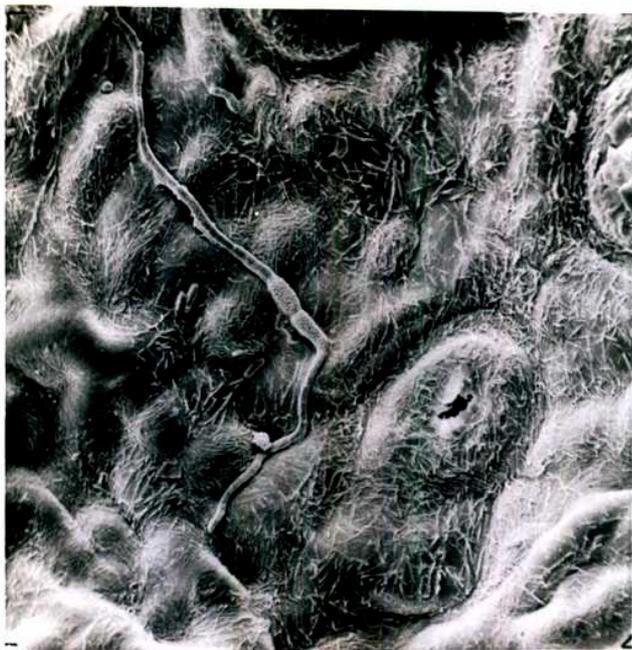


d

e- hoja joven, cara abaxial, 1200 X, mayo 1982. Conidio germinado,
¿ Cladosporium herbarum ?

f- hoja joven, cara adaxial, 3000 X, mayo 1982. Conidio germinado. El micelio comienza a disponerse en la depresión del estoma, y las ramificaciones se dirigen hacia el ostíolo.

LAMINA II (cont.)



e



f

BIBLIOGRAFIA

- AINSWORTH, G.C., 1971. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Comm. Mycol. Inst. Kew, Surrey. 663 p.
- ALLEN, T.F., 1973. A microscopic pattern analysis of an epiphyllous tropical alga, Phycopeltis expansa Jennings. J. Ecol., 61: 887-899.
- ANDREWS, J.H. & C. KENERLEY, 1980. Microbial populations associated with buds and young leaves of apple. Can. J. Bot., 58: 847-855.
- , --- & E.V. NORDHEIM, 1980. Positional variation in phylloplane microbial populations within an apple canopy. Microb. Ecol., 6 (1): 71-84.
- APINIS, A.E., G.G.C. CHESTERS & H.K. TALIGDALA, 1972. Colonization of Phragmites communis leaves. Nova Hedwigia, 23: 113-124.
- BAKER, G.E., P.H. DUNN & W.S. SAKAI, 1979. Fungus communities associated with leaf surfaces of endemic vascular plants in Hawaii. Mycologia, 71: 272-292.
- BARNES, G. & N.F.B. NEVE, 1968. Examination of plants surface microflora by the scanning electron microscope. Trans. Br. mycol. Soc., 51: 811-812.
- BEECH, F.W. & R.R. DAVENPORT, 1971. A survey of methods for the quantitative examination of the yeast flora of apple and grape leaves. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.

- BELIN, J.M. & P. HENRY, 1973. Repartition des levures a la surface de la tige de vigne. Comptes Rendus Seánc.Acad. Scien., 277: 1885-1887.
- BELL, M.K., 1974. Decomposition of herbaceous litter. En: Dickinson, C.H. & G.J.F. Pugh (Eds.). Biology of Plant Litter Decomposition. Academic Press, London. 775 p.
- BENZECRI, J.P., 1976. L'analyse des données. II-L'analyse des correspondances. Dunod. (Ed.), Paris. 616 p.
- BERNSTEIN, M.E., H.M. HOWARD & G.C. CARROLL, 1973. Fluorescence microscopy of Douglas fir foliage epiflora. Can. J. Microb., 19: 1129-1130.
- & G.C. CARROLL, 1977. Microbial populations on Douglas fir needle surfaces. Microbial Ecology, 4: 41-52.
- BOLAY, A., A. SEMECNIC & V. DUCROT, 1968. L'excoriose de la vigne. Agriculture romande VII (4) série A: 45-50.
- BOSE, S.R., 1947. Hereditary (see-borne) symbiosis in Casuarina equisetifolia Forst. Nature (London), 159: 512-514.
- BOTTLIKOVA, A., P.H. DAGET, J. DRDOS, J.L. GUILLERM, F. ROMANE & RUZICKOVA, H., 1976. Quelques résultats obtenus par l'analyse factorielle et les profils écologiques sur des observations phyto-écologiques recueillies dans la vallée de Liptov (Tchécoslovaquie). Vegetatio, 31 (2): 79-91.
- BOULLARD, B., 1951. Champignons endophytes de quelques fougères indigènes et observations relatives à Ophioglossum vulgatum L. Botaniste, 35: 257-280.

- BRADY, B.L., 1960. Occurrence of Itersonilia and Tilletiopsis on lesions caused by Entyloma. Trans. Br. mycol. Soc., 43: 31-50.
- BRAY, J.R. & J.T. CURTIS, 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecol Monogr., 27: 325-349.
- BREEZE, E.M. & N.J. DIX, 1981. Seasonal analysis of the fungal community on Acer platanoides leaves. Trans. Br. mycol. Soc. 77 (2): 321-328.
- BRITTON, R.H. & V.D. PODLEJSKI, 1981. Inventory and classification of the wetlands of the Camargue (France). Aquatic Botany, 10: 195-228.
- BROWN, W., 1922. Studies in the physiology of parasitism VIII. On the exosmosis of nutrient substances from the host tissue into the infection drop. Annals of Botany, 36: 101-119.
- BUCKLEY, N.G. & G.J.F. PUGH, 1971. Auxin production by phylloplane fungi. Nature (London), 231: 332.
- BULLER, A.H.R., 1933. Researches on Fungi. Vol V. Longmans, Green and Co., London.
- BUNSTER REYES, L., 1981. Sucesión fúngica asociada a la descomposición de acículas de Pinus radiata D. Don. Tesis para optar al grado de Licenciado en Biología. Univ. de Chile. (inédita).
- BURGES, A., 1939. Soil fungi and roof infections. Broteria, 8: 64-81
- BURGOS, J.J., 1944. Características del clima de La Plata y algunas de sus consecuencias fitoecológicas. Rev. Arg. Agr., 11 (2): 116-128.

- , 1968. El clima de la Pcia. de Buenos Aires en relación con la vegetación natural y el suelo. En: Cabrera, A.L. Flora de la Provincia de Buenos Aires. Tomo IV, Parte I. Colección Científica del I.N.T.A., Buenos Aires. 623 p.
- BURRI, R., 1903. Die Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. Zbl. Bakt., (2 abt.), 10: 756-763.
- CAMPBELL, R., 1972. Electron microscopy of the epidermis and cuticle of the needles of Pinus nigra var. maritima in relation to the infection by Lophodermella salicigena. Annals of Botany, 36: 307-314.
- CARROLL, G.C., E.M. MÜLLER & B.C. SUTTON, 1977. Preliminary studies on the incidence of needles endophytes in some European conifers. Sydowia, 29: 87-103.
- & F.E. CARROLL, 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Can. J. Bot., 56: 3034-3043.
- , L.H. PIKE, J.R. PERKINS & M. SHERWOOD, 1980. Biomass and distribution patterns of conifer twig microepiphytes in a Douglas fir forest. Can. J. Bot., 58: 624-630.
- CODNOR, R.C. & B.C. PLATT, 1959. Light induced production of carotenoid pigments by Cephalosporia. Nature (London), 184:741.
- COOKE, R., 1977. The biology of symbiotic fungi. J. Wiley & Sons., London. 282 p.
- COOKE, W.B., 1954. The use of antibiotics in media for the isolation of fungi from polluted water. Antibiotics and Chemotherapy

- py, 4: 657-662.
- COLLANTES, M. B. & J.P. LEWIS, 1980. Ordenamiento de las comunidades vegetales del departamento Rosario (Prov. Santa Fe, Argentina). Ecosur, 7 (14): 171-184.
- COLLINS, M.A., 1976. Colonization of leaves by phylloplane saprophytes and their interactions in this environment. En: Dickinson & T.F. Preece (Eds.). Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Academic Press, London. 669 p.
- CORDIER, B., 1965. Analyse factorielle des correspondances. Thèse, Fac. Sc. Rennes. 65 p.
- CROSSE, J. E., 1959. Bacterial canker of stone-fruit, IV Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. Ann. appl. Biol., 47: 306-317.
- , 1963. Bacterial canker of stone-fruit.V- A comparison of leaf-surface populations of Pseudomonas mors-prunorum in autumn on two cherry varieties. Ann. appl. Biol., 52 (1): 97-104.
- , 1965. Ann. appl. Biol. 56: 149.
- CZEKANOWSKI, J., 1913. En: Clifford, H.T. & W. Stephenson (Eds.). An Introduction to Numerical Classification (1975). Academic Press, New York.
- DANSEREAU, P., 1957. Biogeography: an ecological perspective. Ronald Press, New York. 394 p.
- DAVENPORT, R.R., 1970. Epiphytic yeasts associated with the developing grape vine. M. Sc. Thesis, University of Bristol.

- DAVIES, F.R., 1935. Superiority of silver nitrate over mercuric chloride for surface sterilisation in isolation of Ophiobolus graminis Sacc. Can. J. Res., 13: 168-173.
- de BARI, A., 1868. Morfologie u. Physiologie der Pilze, Flechten u. Myxomyceten. Leipzig (Engelmann), 80, XII. 316 p.
- DERX, H.G., 1930. Étude sur les Sporobolomycètes. Ann. mycologici, 28: 1-23.
- DICKINSON, C.H., 1965. The mycoflora associated with Halimione portulacoides. III-Fungi on green and moribund leaves. Trans. Br. mycol. Soc. 48 (4): 603-610.
- , 1967. Fungal colonization of Pisum leaves. Can. J. Bot., 45: 915-927.
- , 1971. Cultural studies of leaf saprophytes. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.
- , 1973. Effects of ethirimol and zineb on phylloplane microflora of barley. Trans. Br. mycol. Soc., 60 (3): 423-431.
- , 1976. Fungi on the aerial surfaces of higher plants. En: Dickinson, C.H. & T.F. Preece (Eds.). Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Academic Press, London. 669 p.
- & B. WALLACE, 1976. Effects of late applications of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. Trans. Br. mycol. Soc., 67 (1): 103-112.
- & T.F. Preece, 1976. Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Academic Press, London. 669 p.

- DIEM, H.G., 1967. Microorganismes de la surface des feuilles. I-Observations préliminaires de la population microbienne de l'Orge. Bull. Ecole. Nat. Sup. Agr. Nancy, 9: 102-108.
- , 1970. Influence de l'humidité atmosphérique sur la survie de quelques champignons en cours de germination. Comptes rendus hebdomadaire séances Académie Sc., 270: 2922-2924.
- , 1973. Phylloplan et phyllosphère. Can. J. Bot., 51: 1079-1080.
- , 1974. Micro-organisms of the leaf surface: Estimation of the mycoflora of the barley phyllosphere. J. Gen. Microb., 80: 77-83.
- di MENNA, M.E., 1959. Yeasts from the leaves of pasture plants. N. Z. J. Agric. Res., 2: 394-405.
- , 1960. Yeasts from Antarctica. J. Gen. Microb., 23: 295-300.
- , 1971. The mycoflora of leaves of pasture plants in New Zealand. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.
- DUGGELLI, M., 1904. Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Kernpflanzen. Zbl. Bakt. (2 abt.) 12: 602-614, 695-712.
- EGGINS, H.O.W. & G.J.F. PUGH, 1962. Isolations of cellulose decomposing fungi from soil. Nature (London), 193: 94-95.
- EPSTEIN, E., 1972. Mineral nutrition of plants: principles and perspec-

tive. John Wiley and Sons., Inc. (Eds.). New York. 412 p.

FOKKEMA, N.J., 1968. The influence of pollen on the development of Cladosporium in the phyllosphere of rye. Neth. J. Pl. Pathol., 74: 159-165.

, 1971. The effect of pollen in the phyllosphere of rye on colonization by saprophytic fungi and on infection by Helminthosporium sativum and other leaf pathogens. Neth. J. Pl. Pathol., 77, suppl.1.

FONT QUER, P., 1965. Diccionario de Botánica. Ed. Labor, Barcelona-Madrid. 1244 p.

FRANKE, W., 1967. Mechanisms of foliar penetration of solutions. Ann. Rev. Plant. Physiol., 18: 281-300.

FRANKLAND, J.C., 1966. Succession of fungi on decaying petioles of Pteridium aquilinum. J. Ecol., 54 (1): 41-63.

, 1969. ibid. J. Ecol., 57: 23-36.

, 1974. Decomposition of lower plants. En: Dickinson, C.H. & G.J.F. Pugh (Eds.). Biology of Plants: Litter Decomposition. Academic Press, London. 775 p.

FRIEND, R.J., 1965. A study of sooty mould on lime trees (Tilia x Vulgaris). Trans. Br. mycol. Soc., 48 (3) 367-370.

GAMUNDI, I.J., A.M. ARAMBARRI, J. FRANGI & H. SPINEDI. Variación estacional de la micoflora en la hojarasca de Nothofagus dombevi. (en prensa).

- GARG, A.P. & P.D. SHARMA, 1980. Phylloplane microfungi of non-infected and rust-infected barley and triticale. Acta Bot. Indica, 8: 57-60.
- GARRETT, S.D., 1951. Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships. New Phytologist, 50: 149-166.
- , 1963. Soil Fungi and Soil Fertility. Pergamon Press, Oxford. 165 p.
- GESSNER, R.V., R.D. GOOS & J. MCN. SIEBURTH, 1972. The fungal microcosm of the internodes of Spartina alternifolia. Marine Biology, 16: 269-273.
- GODEAS, A.M., 1977. Estudio cuali y cuantitativo de los hongos del suelo del bosque de Nothofagus dombeyi. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires (inédita).
- GODFREY, B.E.S., 1974. Phylloplane mycoflora of bracken, Pteridium aquilinum. Trans. Br. mycol. Soc., 62 (1): 305-311.
- GOURBIER, F., 1974. Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (Abies alba Mill.). I- Premiers résultats. Bull. Soc. Mycol. Fr., 90: 89-96.
- , 1975. Les champignons microscopiques liés aux aiguilles de sapin (Abies alba Mill.). III- Microflore des aiguilles vivantes. Bull. Soc. Mycol. Fr., 91: 429-441.
- GREGORY, P.H., 1971. The leaf as a spor trap. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.

- , 1973. *The Microbiology of the Atmosphere*. Leonard Hill, London.
- & J.M. HIRST, 1957. The summer air-spore at Rathemsted in 1952. J. Gen. Microb., 17: 135-152.
- GRIME, J.P., 1979. *Plant Strategies and Vegetation Processes*. J. Wiley, Chichester-New York.
- HALLAM, N.D. & B.E. JUNIPER, 1971. The anatomy of leaf surface. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). *Ecology of Leaf Surface Micro-organisms*. Academic Press, London. 640 p.
- HARLEY, J.L. & J.S. WAID, 1955. A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. Trans. Br. mycol. Soc., 38: 104-118.
- HERING, T.F., 1965. The succession of fungi in the litter of a lake district oakwood. Trans. Br. mycol. Soc., 48: 391.
- & P.B. NICHOLSON, 1964. A clearing technique for the examination of fungi in plant tissue. Nature (London), 201: 942-943.
- HEUVEL, J. van den, 1969. Effects of Aureobasidium pullulans on numbers of lesions on dwarf bean leaves caused by Alternaria zinniae. Neth. J. Pl. Path., 75: 300.
- HILTNER, L., 1903. Beiträge zur Mycorrhizafrage. I. Über die biologische und physiologische Bedeutung der endotrophen Mycorrhiza. Naturw. Zeitschr. f. Londu. Forstwirtschaft, I: 9-25.
- HISLOP, E.C. & T.W. COX, 1969. Effects of captan on the non-parasitic

- microflora of apple leaves. Trans. Br. mycol. Soc., 52 (2): 223-235.
- HIRST, J.M., 1953. Changes in atmospheric spore content: diurnal periodicity and the effects of weather. Trans. Br. mycol. Soc., 36 (3): 375-393.
- HOFFMAN, J.A. The maritime influence on the climate of River Plate zone (inédito).
- HOGG, B.M. & H.J. HUDSON, 1966. Micro-fungi on leaves of Fagus sylvatica. I- The micro-fungal succession. Trans. Br. mycol. Soc., 49 (2): 185-192.
- HUDSON, H. J., 1962. Succession of micro-fungi on ageing leaves of Saccharum officinarum. Trans. Br. mycol. Soc., 45 (3): 395-423.
- , 1968. The ecology of fungi on plants remains above the soil. New Phytol., 67: 837-874.
- , 1971. The development of the saprophytic fungal flora as leaves senesce and fall. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.
- & J. WEBSTER, 1958. Succession of fungi on decaying stems of Agropyron repens. Trans. Br. mycol. Soc., 41 (2): 165-177.
- ISAAC, P.K., 1960. A whole-mount technique for studying infected leaves. Phytopathology, 50: 474-475.

- JONES, B.S., 1962. Leaf clearing technique to assist spore germination counts. Nature (London), 193: 1099-1100.
- KEENER, P.D., 1950. Mycoflora of buds. I- Results of cultures from non-irradiated materials of certain woody plants. American J. Bot., 37: 520-527.
- KENDRICK, W.B. & A. BURGESS, 1962. Biological aspects of the decay of Pinus sylvestris leaf litter. Nova Hedwigia, 4: 313-342.
- KERLING, L.C.P., 1958. De microflora op het blad van Beta vulgaris. Tijdschr. Planteziekten, 64: 402-410.
- , 1964. Fungi in the phyllosphere of leaves of rye and strawberry. Meded. Landb-Hoogeschool Opzoekings Gent., 29: 885.
- KHUDYAKOV, Y.P., 1961. Epiphytische Mikroorganismen und die Möglichkeit ihrer Verwendung zum Schutze der Pflanzen gegen Krankheiten. Tagungsber. dtsh. Acad. Landwiss., Berl., 41: 135-144
- KILBERTUS, G., 1970. Décomposition des végétaux. I- Observations de la surface des feuilles de Brachypodium pinnatum P.B. au microscope à balayage. Bull. de l'Ecole Nat. Sup. Agron. Nancy, 12: 59-61.
- KLUYVER, A.J. & C.B. van NIEL, 1924. Über Spiegelbilder erzeugende Hefenarten und die neue Hefengattung Sporobolomyces. Centralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 63: 1-20.
- KOVACS, A. & SZEDKE, E., 1956. Die phytopathologische Bedeutung der kutikulären Excretion. Phytopath. Z., 27: 335-349.

- KROULIK, S.T., L.A. BURKEY & H.G. WISEMAN, 1955. The microbial populations of the green plants and of the cut forage prior to inailing. J. Dairy Sci., 38: 256-262.
- LACOSTE, A. & M. ROUX, 1971. L'analyse multidimensionnelle en phytosociologie et en écologie. Application a des données de l'étage subalpin des Alpes maritimes. Oecol. Plant., 6: 353-359.
- LAL, S.P. & A.S. YADAV, 1964. A preliminary list of microfungi associated with the decaying stems of Triticum vulgare and Andropogon sorghum. Indian Phytopath., 17:208.
- LAMB, R.J. & J.F. BROWN, 1970. Non-parasitic microflora on leaf surfaces of Paspalum dilatatum, Salix babylonica and Eucalyptus stellulata. Trans. Br. mycol. Soc., 55 (3): 383-390.
- LANGE, A. de & C. LEBEN, 1970. Colonization of cucumber buds by Pseudomonas lachrymans in relation to leaf symptoms. Phytopathology, 60: 1865-1866.
- LANGE, A. de & C. LEBEN, 1971. The cucumber bud as a possible factor in the pathogenesis of Pseudomonas lachrymans. In: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London 640 p.
- LAST, F.T., 1955. Seasonal incidence of Sporobolomyces on cereal leaves. Trans. Br. mycol. Soc., 38: 221-239.
- , 1970. Factors associated with the distribution of some phylloplane microbes. Neth. J. Plant Pathol. 76: 140-143.
- & F.C. DEIGHTON, 1965. The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves. Trans. Br. mycol. Soc., 48: 83-99.

- & R.C. WARREN, 1972. Microbios no parásitos colonizadores de hojas vivas: su forma y funciones. Endeavour, 31: 143-150.
- LATCH, G.C.M. & E.H. Mc KENZIE, 1977. Fungal flora of rye grass swards in Wales. Trans. Br. mycol. Soc., 68 (2): 181-184.
- LEACH, C.M., 1971. A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. En: Booth, J. (Ed.). Methods in Microbiology. Vol IV. Academic Press London.
- LEBART, L. & J.P. FENELON, 1971. Statistiques et informations appliquées. Dunod, Paris. 426 p.
- LEBEN, C., 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Annual Review of Phytopathology, 3: 209-230.
- , 1969. Colonization of soybean buds by bacteria: observation with the scanning electron microscope. Can. J. Microbiol., 15: 319-320.
- , 1971. The bud in relation to the epiphytic microflora. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press London. 640 p.
1972. Micro-organisms associated with plant bud. J. Gen. Microbiol., 71: 327-331.
- , V. RUSCH, A.F. SCHMITTNER, 1968. The colonizations of soybean buds by Pseudomonas glycinea and other bacteria. Phytopathology, 58: 1677-1681.
- , M.N. SCHROTH & D.C. HILDEBRAND, 1970. Colonization and

- movement of *Pseudomonas glycinea* on healthy bean seedlings. Phytopathology. 60: 677-680.
- LEWIS, F.J., 1924. An endotrophic fungus in the Coniferae. Nature (London), 114: 860.
- LINDSEY, B.I., 1976. A survey of methods used in the study of micro-fungal succession on leaf surface. En: Dickinson, C.H. & T.H. Preece (Eds.). Microbiology of Aerial Plants Surfaces. Academic Press, London. 669 p.
- & G.J.F. PUGH, 1976. Succession of microfungi on attached leaves of *Hippophaë rhamnoides*. Trans. Br. mycol. Soc., 67 (1): 61-67.
- LOPEZ, S.E. Sucesion fúngica en madera de *Eucalyptus viminalis* (Myrtaceae). I- Basidiomycetes sobre árbol vivo y troncos en estiba. Bol. Soc. Arg. Bot. (en prensa).
- LUGINBUHL, M. & E. MÜLLER, 1980. Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gluchen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). Sydowia, Ann. Mycol. Ser II, 33: 185-209.
- MACAULEY, B. J. & L. B. THROWER, 1966. Succession of fungi in leaf litter of *Eucalyptus regnans*. Trans. Br. mycol. Soc., 49: 509-520.
- Mc BRIDE, R.P. & A.J. HAYES, 1977. Phylloplane of European larch. Trans. Br. mycol. Soc., 69 (1): 39-46.
- Mc KENZIE, E.H.C. & H.J. HUDSON, 1976. Mycoflora of rust-infected and non-infected material during decay. Trans. Br. mycol. Soc., 66: 223-238.

- Mc LENNAN, E., 1920. The endophytic fungus of Lolium, I. Proc. Roy. Soc. Victoria, XX·II (N.S.): 252.
- MEREDITH, D.S., 1960. Further observations on fungi inhabiting pine stumps. Ann. Bot. N. S., 24: 63-67.
- , 1962. Some fungus on decaying banana leaves in Jamaica. Trans Br. mycol. Soc., 45:335.
- MES, M. G., 1954. Excretion (recretion) of phosphorus and other mineral elements by leaves under the influence of rain. S. Afr. J. Sci., 50: 167-172.
- MISHRA, R.R. & C.H. DICKINSON, 1981. Phylloplane and litter fungi of Ilex aquifolium. Trans. Br. mycol. Soc., 77 (2): 329-337.
- NEIL, J.C., 1940. The endophyte of rye-grass (Lolium perenne). N. Z. J. Sci. Tech., 21: 280-291.
- NICOT, J. 1960. Some characteristics of the microflora in desert sands. In: Parkinson, D. & J.S. Waid (Eds.). Ecology of Soil Fungi ; an International Symposium. Liverpool university Press. 323 p.
- NORSE, D., 1971. Latent infection and the onset of visual disease development by Alternaria longipes (Ell. & Ev.) Mason. Procc. of the Fifth International Tobacco Sci. Cong., Hamburgo, 1970.
1972. Fungi isolated from surface-sterilized tobacco leaves. Trans. Br. mycol. Soc., 58 (3): 515-518.
- PADY, S.M., 1973. Ballistospore discharge in Tilletiopsis minor. Can. J. Bot., 51: 589-593.

- , 1974. Sporobolomyces in Kansas. Mycologia, 66: 333-338.
- PALM, B.T., 1934. On parasitic and epiphyllous algae. Ark. Bot., 25 A: 1-16.
- PARK, D., 1957. Behaviour of soil fungi in the presence of bacterial antagonists. Trans. Br. mycol. Soc., 40: 283-291.
- PATON, A.M., 1964. J. appl. Bact., 27: 237-243.
- PENNYCOOK, S.R. & F.J. NEWHOOK, 1978. Spore fall as a quantitative method in phylloplane studies. Trans. Br. mycol. Soc., 71 (3): 453-456.
- PESANTE, A., 1963. Considerazione su una fumagine d'aspetto inconsueto. Boll. Lab. Spar. Oss. Fitopatol., 26(2): 19-26.
- PETRINI, O & E. MÜLLER, 1979. Pilzliche Endophyten, am Beispiel von Juniperus communis L. Sydowia, Ann. Mycol. Ser II, 32 (1-6): 224-251.
- & G. CARROLL, 1981. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. Can J. Bot., 59: 629-636.
- POTTER, M.C., 1910. Bacteria in their relation to plant pathology. Trans. Br. mycol. Soc., 3: 150-168.
- PREECE, T.F., 1962. Removal of apple leaf cuticle by pectinase to reveal the mycelium of Venturia inaequalis (Cooke) Wint. Nature (London), 193: 902-903.
- & C.H. DICKINSON, 1971. Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.

PUGH, G.J. F , 1958. Leaf li ter fungi found on Carex paniculata.
Trans. Br. mycol. Soc., 41 (2): 185-195.

, 1962. Studies of fungi in coastal soil. I- Cercospora salina Sutherland Trans. Br. mycol. Soc., 45 (2): 255-260.

, 1974. Terrestrial fungi. En: Dickinson, D.H. & G.J.F. Pugh (Eds.). Biology of Plant Litter Decomposition. Academic Press, London. 775 p.

, 1980. Strategies in fungal ecology. Trans. Br. mycol. Soc., 75 (1): 1-14.

& G.M. WILLIAMS, 1968. Fungi associated with Salsola kali.
Trans. Br. mycol. Soc., 51 (3-4): 389-396.

& N.G. BUCKLEY, 1971 a. The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.

& --- , 1971 b. Aureobasidium pullulana: an endophyte in sycamore and other trees. Trans Br. mycol. Soc., 57 (2): 227-231.

& J.L. MULDER, 1971. Mycoflora associated with Typha latifolia. Trans. Br. mycol. Soc., 57 (2): 273-282.

RAYNER, R.W., 1948. Latent infection in Coffea arabica L. Nature (London), 161: 245-246.

ROMANE, F., 1972. Utilisation de l'analyse multivariable en phytoécologie. Investigación Pesquera, 36 (1): 131-139.

- ROYLE, D.J., 1976. Scanning electron microscopy of plant surface micro-organisms. En: Dickinson, C.H. & T.F. Preece (Eds.). Microbiology of Aerial Plant Surface. Academic Press, London. 669 p.
- & G.G. THOMAS, 1971. Observations with the scanning electron microscope on the early stages of hop leaf infection by Pseudoperonospora humuli. Physiological Plant Pathology, 1: 345-349.
- RUINEN, J., 1956. Occurrence of Beijerinckia species in the "phyllosphere". Nature (London), 177: 220.
- , 1961. The Phyllosphere. I- An ecological neglected milieu. Plant and Soil, XV (2): 81-109.
- , 1963. The Phyllosphere. II- Yeast from the phyllosphere of tropical foliage. Ant. van Leeuwenhoek, 29: 425-438.
- , 1965. Plant and Soil, XXII: 275-294.
- , 1971. The grass sheath as a site for nitrogen fixation. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.
- RUSCOE, Q.W., 1971. Mycoflora of living and dead leaves of Nothofagus truncata. Trans. Br. mycol. Soc., 56 (3): 463-474.
- SAMPSON, K., 1933. The systemic infection of grasses by Epichloë typhina (Pers.) Tul. Trans. Br. mycol. Soc., 18: 30-47.
- , 1935. The presence and absence of an endophytic fungus in Lolium tumulentum and L. perenne. Trans. Br. mycol. Soc., 19: 337-343.

- , 1938. Further observations on the systemic infections of Lolium. Trans. Br. mycol. Soc., 21: 84-97.
- , 1939. Additional notes on the systemic infection of Lolium. Trans. Br. mycol. Soc., 23: 316-319.
- SCHOEPP, H., 1961. Untersuchungen über Guignardia citricarpa Kiely, dem Erreger der Schwarzfleckenkrankheit auf Citrus. Phytopath. Z., 40: 258-271.
- SHARMA, J.K., 1974. Colonization of saprophytic microfungi and bacteria on the aerial parts of Sesamum orientale L. and Gossypium hirsutum L. Ph D. thesis. University of Delhi.
- & K.G. MUKERJI, 1973. Microbial colonization of aerial parts of plants—a review. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung., 8: 425-461.
- & ---, 1974. Incidence of pathogenic fungi on leaves. Indian Phytopathol., 27: 558-566.
- & ---, 1976. Microbial ecology of Sesamum orientale L. and Gossypium hirsutum L. In: Dickinson, C.H. & T.F. Preece (Eds.). Microbiology of Aerial Plants Surface. Academic Press, London. 669 p.
- & A.P. GARG, 1979. Phylloplane mycoflora of non-infected and powdery mildew-infected barley. Acta Bot. Indica, 7: 64-71.
- SHEAR, C.L. & A.K. WOOD, 1913. Studies of fungous parasites belonging to the genus Glomerella. Bull. of the Bureau of Plants Industry, U.S. Depart. of Agric., 252.

- SHERWOOD, M. & G. CARROLL, 1974. Fungal succession on needles and young twigs of old-growth Douglas fir. Mycologia, 66: 499-506.
- SHIPTON, A. & J.F. BROWN, 1962. A whole leaf clearing and staining technique to demonstrate host-pathogen relationships of wheat and stem rust. Phytopathol., 52: 1313.
- SINHA, S., 1971. The microflora on leaves of Capsicum annuum (L.) Watt, Solanum melongena L., Solanum tuberosum L. and Lycopersicon esculentum Mill. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.
- SMIT, J. & K.T. WIERINGA, 1953. Microbiological decomposition of litter. Nature (London), 171: 794-795.
- SOKAL, R.R. & P.A. SNEATH, 1963. Principles of Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Co, San Francisco. 338 p.
- SORENSEN, T., 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species contents. En: R.P.Mc. Intosh Benchmark (Ed.). Phytosociology. Papers in Ecology No 6. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc, Strandsburg, Pennsylvania (1978). 388 p.
- STADELMANN, F., 1976. Die Apfel-und Birnen-Phyllosphären- Mikroflora und ihre Beeinflussung durch biotische und abiotische, insbesondere durch Venturia inaequalis (Cke.) Wint. und Venturia pirina (Bref.) Aderh. Ph. D. Thesis. Univ. Basel. Basel.
- STOUT, J.D., 1960. Biological studies of some tussock-grassland soils XV. Bacteria of two cultivated soils. N. Z. J. Agric. Res., 3: 214-223.

- TALIGOALA, H.K., 1969. Studies in the colonization of Phragmites communis Trin. by microfungi. Ph. D. thesis. University of Nottingham, Inglaterra.
- TEWARI, R.P., 1973. Investigations into phyllosphere microflora of certain crop plants. Ph. D. thesis. University of Gorakhpur, India.
- TOKUNAGA, Y & M. YOKOHAMA, 1955. Latent infections associated with some fruit disease. En: Jubilee Publications in Commemoration of Sixtieth Birthday of Professor Tochikai and Pr. Fukushi, 249-254. Minato-ku, Tokyo.
- & I. OHIRA, 1973. Latent infection of anthracnose on Citrus in Japan. Rept. Tottori Mycol. Inst.(Japan), 10: 693-702.
- TSUNEDA, A. & W.P. SKOROPAD, 1978. Phylloplane fungal flora of rapeseed. Trans. Br. mycol. Soc., 70 (3): 329-333.
- TUKEY (Jr), H.B., 1971. Leaching of substances from plants. En: Preece, T.F. & C.H. Dickinson (Eds.). Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. Academic Press, London. 640 p.
- , S.H. WITTWER & H.B. TUKEY, 1957. Leaching of carbohydrates from plant foliage as related to light intensity. Science, 126:120.
- TUKEY, H. B., H.B. TUKEY (Jr) & S.H. WITTWER, 1958. Loss of nutrients by foliar leaching as determined by radio isotopes. Proc. Am. Soc. hort. Sci., 71: 496-506.
- & J.V. MORGAN, 1963. Injury to foliage and its effect upon the leaching of nutrients from above-ground plant parts. Physiologia Pl., 16:557-564.

- VOZNAYAKOVSKAYA, Y.M. & Y.P. KHUDYAKOV, 1960. Species composition of the epiphytic microflora of living plants. Microbiologiya, 29: 97-103.
- WARNOCH, D.W. & T.F. PREECE, 1971. Location and extent of fungal mycelium in grain barley. Trans. Br. mycol. Soc., 56 (2): 267-273.
- WEBSTER, J., 1956. Succession of fungi on decaying cocksfoot culms I. J. Ecol., 44 (2): 517-544.
- , 1957. ibid. J. Ecol., 45 (1): 1-30.
- WELTY, R.E., G.B. LUCAS, J.T. FLETCHER & H. YOUNG, 1968. Fungi isolated from tobacco leaves and brown spot lesions before and after flue-curing. App. Microbiol., 16:9.
- WILDMAN, H.G. & D. PARKINSON, 1979. Microfungal succession on living leaves of Populus tremuloides. Can. J. Bot., 57: 2800-2811.
- WINGRADSKY, S., 1924. Sur la microflore autochthone de la terre arable. Comptes rendus hebd. Séances Acad. Sci., Paris, 178: 1236-1239.
- WOLLER, H., 1929. Über die epiphytische Bacterienflora gesunder grüner Pflanzen. Zbl. Bakt. (2 abt.), 79: 173-177.
- YADAV, A.S. & M.F. MADELIN, 1968. The ecology of microfungi on decaying stems of Urtica dioica. Trans Br. mycol. Soc., 51 (2): 249-259.