

Tesis Doctoral

Contribución al estudio de los endofitos fúngicos

Bertoni, María Delia Luisa

1989

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 Master's and 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:

Bertoni, María Delia Luisa. (1989). Contribución al estudio de los endofitos fúngicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2279_Bertoni

Cita tipo Chicago:

Bertoni, María Delia Luisa. "Contribución al estudio de los endofitos fúngicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2279_Bertoni

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Registro No. 2279

Copia

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE
LAS ENZIMAS PLANTAS**

Maria Delia Luisa Bertoni

Trabajo para optar al título de Doctora en
Ciencias Biológicas

Director : Dr. Jorge E. Wright
Codirector : Dr. Daniel Cabral

1989

- 2.279 -
Ej: 2.

2279

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge E. Wright por su guía y dirección en el campo de la Micología, por facilitarme el uso de su importantísima biblioteca micológica y por su apoyo cotidiano en las tareas de investigación.

Al Dr. Daniel Cabral por su asesoramiento y colaboración en la diagramación y realización de esta tesis, y de los trabajos derivados de ella. Por tantos años de amistad.

A la Dra. Maria E. Ranalli por ser mi Consejera de Estudios, y por darme la oportunidad en 1975 de retomar la investigación.

A la Dra. Maria C. Maggese en particular, y a los miembros de la cátedra de Embriología en general, por el préstamo del equipo de computación y fundamentalmente por su apoyo y amistad.

A las Lics. Graciela Faifer y Ana Menéndez, y a la Srta. Nuria Romero, por integrar nuestro grupo de trabajo, por sus aportes y colaboración.

Al Ing. Héctor D. Ginzo, a los Lics. Beatriz González y Rubén Lombardo por su disposición para las consultas estadísticas.

Al Analista de sistemas Horacio R. Gutierrez por la programación del WPGM y por su asesoramiento constante en computación.

A la Lic. Andrea I. Romero y a la Dra. Silvia E. López por ayuda, colaboración y compañía durante los muestreos.

A la empresa Silverware S.A. por facilitarme la impresión de esta tesis.

y a Horacio, por cariño, esfuerzo y paciencia que hizo posible la realización de este trabajo.

A MIS PADRES

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
Dispersión y reproducción endofítica	4
Detección de los endofitos	7
a) cultivo e identificación	7
b) observación directa	7
c) serología	8
Localización	8
Interacción hongo-hospedante	9
I) Beneficio para el endofito	11
II) Beneficio para el hospedante	13
1) Crecimiento	13
2) Resistencia a los herbívoros	14
3) Resistencia a los patógenos fúngicos	19
4) Bases químicas de la resistencia a los	
herbívoros	19
4a) Toxinas en <u>Festuca_aundinacea</u>	20
4b) Toxinas en <u>Lolium_perenne</u>	24
III) Control del hospedante sobre el endofito	26
Inoculación artificial	28
Evolución	30
OBJETIVOS	35

CAPITULO I: ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD ENDOFITICA (en Eucalyptus viminalis)

Introducción	38
Materiales y métodos	38
Muestreo	39
Anatomía de la hoja	40
Observación directa de los endofitos	40
Análisis estadístico	41
Resultados	42
Frecuencias de infección	42
Frecuencias de infección de las especies y su distribución	44
Similitud de infección entre hojas	46
Modelo de microcomunidades	55
Anatomía foliar	55
Observación de los endofitos	57
Discusión	57

CAPITULO II: COLONIZACION POR ENDOFITOS SEGUN EL CICLO DE VIDA DEL HOSPEDANTE (en Juncus spp.)

Introducción	64
Materiales y métodos	65
Aislamiento	66
Observación directa de los endofitos	66
Análisis estadístico	67
Resultados	68
Aislamiento	68

Patrones de colonización	72
Discusión	78
CAPITULO III: ENDOFITOS EN LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS PATOGENOS FUNGICOS (en <u>Eucalyptus_viminalis</u>)	
Introducción	88
Materiales y métodos	80
a) Interacción de colonias	90
b) Test de celofán	94
Resultados	95
Discusión	103
CAPITULO IV: ENDOFITOS EN LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS HERBIVOROS	
Parte I: en <u>Baccharis_coridifolia</u>	
Introducción	109
1) Presencia de endofitos	113
Materiales y métodos	113
Resultados	115
2) Presencia de tricotecenos macrocíclicos en plantas y endofitos	117
Materiales y métodos	117
I) Análisis de las plantas de las poblaciones de Magdalena y Gualeguaychú	117
II) Análisis de la producción de tricotecenos por endofitos	118

III) Bieensayo con <u>Artemia salina</u>	120
Resultados	120
Discusi3n	123
Ap3ndice	127
CAPITULO IV (continuaci3n)	
Parte II: en <u>Festuca</u> spp.	
Introducci3n	131
Materiales y m3todos	132
Observaci3n de los endofitos	132
a) en semillas	132
b) en vaina	134
Aislamiento de los endofitos	134
a) a partir de vaina	134
b) a partir de semillas	135
Resultados	135
Discusi3n	139
1) Toxicidad para los herb3voros-presencia de endofitos	
2) Relaciones entre la taxonom3a de <u>Festuca</u> y la presencia de endofitos	141
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFIA	149

INTRODUCCION

El término endofito, originalmente definido por de Bary (1866) incluye cualquier tipo de hongo cuyas hifas invaden tejidos o células de organismos autótrofos. Según Petrini (1986) esta categoría es muy amplia y abarca desde patógenos foliares hasta simbiontes micorrícicos, y sólo contrasta entre hongos internos y epífitos.

Actualmente el término se ha restringido y se consideran patógenos aquellos hongos que causan síntomas visibles de enfermedad, aunque también penetren dentro de la planta y existan endofíticamente (Carroll, 1986). Hongos que existen tanto dentro como fuera de la planta, como las micorrizas, también son excluidos de la categoría de endofitos.

Los endofitos, entonces, comprenden a aquellos hongos que son internos a los tejidos vegetales y causan infecciones asintomáticas en las estructuras aéreas de las plantas, sospechándose que establecen una relación mutualista con el hospedante (Stone, 1987).

Los endofitos fúngicos se hallan distribuidos en una amplia gama de hospedantes . En plantas inferiores tales como Psilotum nudum (L) Griseb (Peterson et al.1981), hepáticas (Schuster, 1966; Pocock y Duckett, 1984) helechos (Boullard, 1951, 1957); coníferas (Carroll et al 1977, Carroll y Carroll, 1978; Petrini y Carroll, 1981; Petrini y Muller, 1979); ericáceas (Petrini et al, 1982, ; Widler y Muller, 1984; Petrini, 1984); Citrus spp. (Tokunaga y Ohira, 1973); Araceae, Bromeliaceae, Orchidaceae (Petrini y Dreyfuss, 1981; Dreyfuss y Petrini, 1984); numerosos pastos (Sampson 1933, 1935; Neill, 1940; Diehl, 1950; Siegel et al 1984, Riesen, 1985; Clay, 1986) y un grupo variado de otras angiospermas (Cabral, 1985; Hepperly et al. 1985; Kulick, 1984; Nathaniels y Taylor, 1983).

Los endofitos más frecuentes pertenecen a las clases de hongos Ascomycetes y Deuteromycetes. Los Basidiomycetes, Zygomycetes y Oomycetes sólo se encuentran esporádicamente. Sin embargo en las hepáticas con fronde, los endofitos encontrados pertenecen principalmente a la clase Basidiomycetes, mientras que en las hepáticas talosas, a los Phycomycetes (Pocock y Duckett, 1984).

Las familias de plantas vasculares más intensamente estudiadas : Pinaceae, Ericaceae, Cupressaceae y poseen una flora endofítica relativamente constante. En general se presentan una o dos especies con alta frecuencia y específicas para el hospedante, y otro

gran número de especies incidentales, con baja frecuencia, y comunes a varios hospedantes.

Lungibühl y Müller (1980) clasifican a los endofitos según esta relación con el hospedante en :

a) raros, que se aíslan sólo por casualidad, y no se conoce bien su relación con el hospedante

b) ubícuos, que están presentes en varios hospedantes pertenecientes a diferentes familias de plantas

c) específicos, que sólo se los encuentra en un determinado hospedante o familia de hospedantes.

Los endofitos ubícuos más comunes son Geniculisporium, Phyllosticta, Phomopsis, Cryptocline, Lophodermium (Petrini, 1986). En tanto que los específicos pertenecen al género Acremonium en los pastos (Acremonium coenophialum en Festuca arundinacea y A.lolii en Lolium perenne, Clay, 1986), y a las especies Cloroscypa chloromella Phill y Hork. en Sequoia sempervirens y Chloroscypa seaveri (Rehm) Seaver en Thuja plicata y Chamaecyparis lawsoniana.

La hipótesis actual, es que los endofitos son específicos sólo a nivel de familia de hospedantes, por ej: un endofito específico para la familia Pinaceae, nunca será hallado en familias no relacionadas taxonómicamente como Ericaceae o Graminae, pero sí podría ser aislado de

hospedantes pertenecientes a familias relacionadas taxonómicamente, ej: Coleophoma_emptri (Roestr.) Petrak, y Phyllosticta_pyrolae, se los encuentra en Ericaceae y Pyrolaceae, dos familias de la subclase Ericales (Petrini, 1985).

La comparación de poblaciones endofíticas entre los hospedantes, puede en algunos casos, ser útil como información taxonómica complementaria (Petrini, 1986), sólo cuando los hongos son abundantes y de distribución amplia (Carroll y Carroll, 1978).

En cuanto a la distribución geográfica de los endofitos específicos, estaría relacionada con la distribución de sus hospedantes. Carroll y Carroll (1978) aislaron un número de endofitos de Pseudotsuga_menziesii (abeto de Douglas) de la región de Oregon (USA), que ya habían sido hallados para el mismo hospedante en Europa (Carroll et al, 1977).

Dispersión y Reproducción de los endofitos

Se reconocen dos modos de reproducción y dispersión

a) donde el endofito no produce ningún tipo de estructuras de reproducción y es totalmente interno al hospedante (ej. endofitos en pastos, lám.I). El endofito es de origen sistémico alojándose en el óvulo en desarrollo .

Lámina I

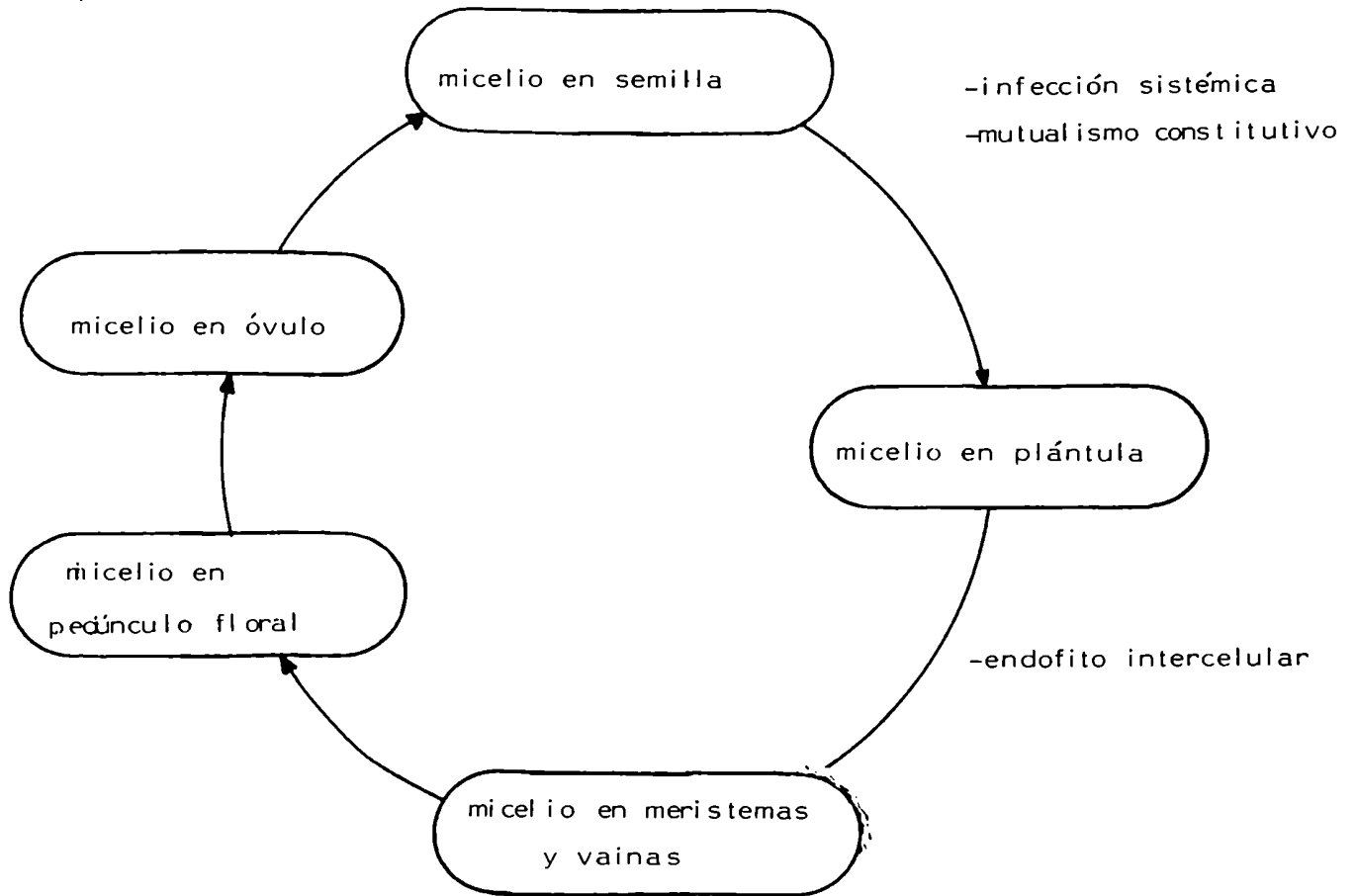
- a) ciclo de vida de un endofito en pastos (ej. A.coenophialum)

- b) transmisión de endofitos vía esporas, desde plantas infectadas a plantas sanas

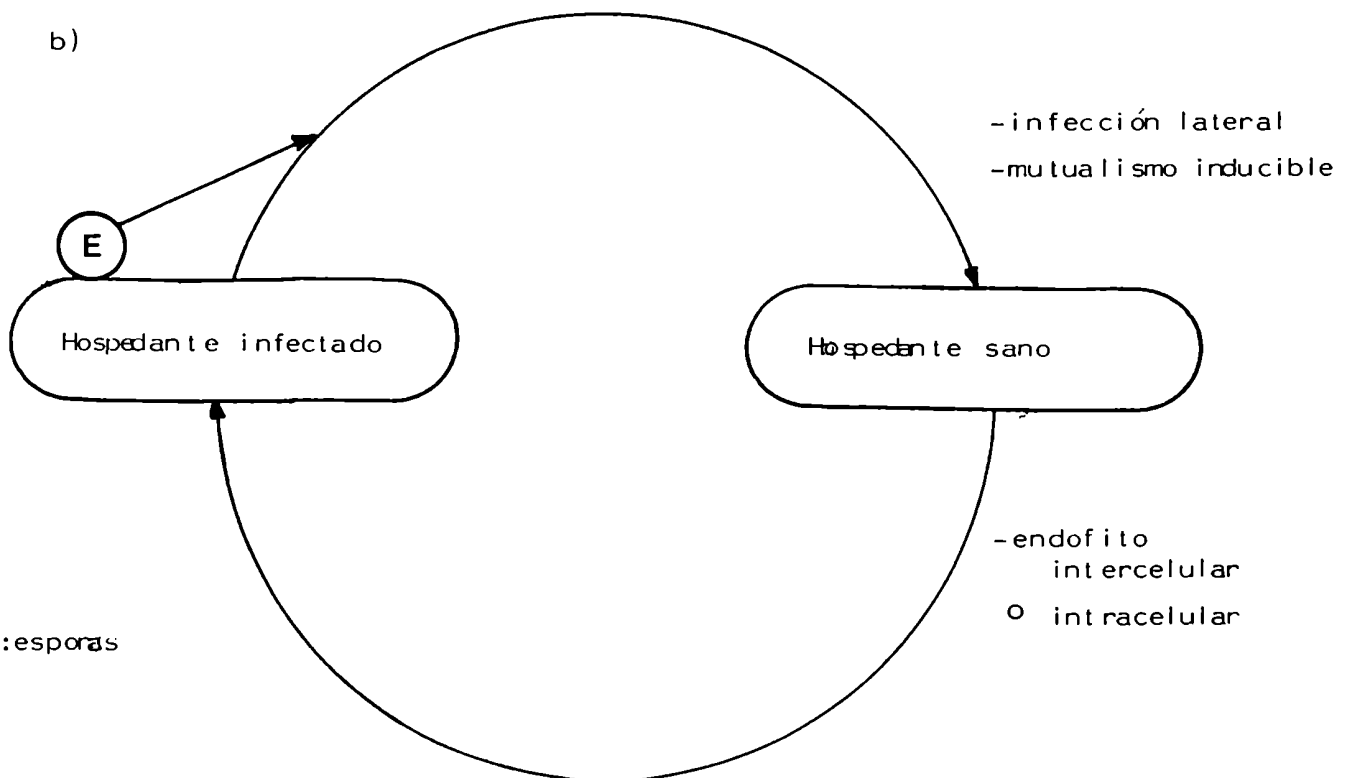
Lámina 1

Dispersión y reproducción de los endofitos

a)



b)



E: esporas

Al producirse la semilla ésta también se encuentra internamente infectada y por lo tanto actúa como agente de dispersión del hongo. El endofito es así transmitido de generación en generación (Funk et al.1983; Siegel et al.1984).A este tipo de relación hospedante-endofito Carroll (1986) lo denomina mutualismo constitutivo.

b) donde el endofito infecta tejidos sanos de un nuevo hospedante a partir de fructificaciones en tejido senescente o muerto de un hospedante infectado. Esta infección es lateral u horizontal, y el mutualismo resultante es del tipo inducible (Carroll, 1986).El hongo se instala en tejidos senescentes o metabólicamente inactivos tales como xilema, corteza y epidermis. En las hojas, la infección puede ser intracelular o intercelular, de poca extensión no afectando el funcionamiento general del órgano (Stone, 1986).

Un caso especial ocurre cuando el hongo produce tejido estromático en el tejido vivo del hospedante, e inhibe la iniciación floral, causando la esterilidad del mismo. Los endofitos Epichloe__typhina, Atkinsonella hypoxylon, Balansia__obtecta y Balansia_cyperis provocan el aborto de inflorescencias en sus hospedantes.

En estos casos el costo energético de la planta es alto. Sin embargo la pérdida de la reproducción sexual esta compensada por un mayor vigor vegetativo de la planta infectada (Clay, 1984).

Detección de endofitos

a) cultivo e identificación

Los endofitos pueden ser aislados a partir del tejido vegetal vivo previa esterilización superficial del y posterior siembra sobre medios sintéticos o semisintéticos.

Algunos presentan problemas para su identificación porque fructifican en el hospedante y en cultivo mantienen la condición vegetativa. Otros pueden ser inducidos a esporular cultivándolos sobre distintos medios naturales ("corn meal agar", agar papa glucosado), sintéticos (agar Czapek) o en trozos esterilizados del material vegetal original, en medio de agar agua al 2%.

También el tratamiento con luz ultravioleta cercana, en ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad puede dar buenos resultados. Un factor importante es el tiempo de cultivo. Muchos endofitos crecen muy lentamente y sólo fructifican al cabo de 1-2 meses de inoculados. En estos casos el riesgo de contaminación por otros hongos y bacterias es mayor.

b) Observación directa

Previamente se trata el tejido vegetal o semilla para clarificación (Hering y Nicholson, 1964) o

ablandamiento, y luego se tiñe con trypan blue-lactofenol (Phillips y Hayman, 1970); verde de malaquita-fucsina ácida (Alexander, 1980); chlorazol Black E (Brundett et al.1984).

El tratamiento y tinción de las semillas para detectar la presencia o ausencia de endofitos es un test corriente que permite conocer la contaminación de las semillas y prevenir la infección posterior de la planta (Clark et al.1983).

c) serología

La preparación de antisueros a partir de cultivos de endofitos (en particular de A.coenoccephalum y A.lolii), utilizados en inmunoensayo ELISA, permite detectar antígenos de los endofitos en las plantas analizadas. Es un método extremadamente sensible, aún cuando puedan existir variaciones estacionales del endofito, ya que el antígeno está siempre presente (Reddick, 1988). Esta técnica es particularmente útil para determinar la localización y cantidad de micelio en las plantas infectadas, y para detectar micelio endofítico en semilla (Johnson et al.1983).

Localización

En las semillas se encuentran endofitos sistémicos del tipo Acremonium spp, asociados a la capa de aleurona. Durante la germinación de la semilla, el hongo invade el

endosperma amiláceo y se detecta en plántulas de 3-5 semanas. La mayoría del micelio se halla en la vaina, poco en el tallo y casi nada en la raíz. Durante el crecimiento de la planta, el hongo crece intercelularmente, sin penetrar o dañar las células del hospedante. Probablemente entre al primordio floral antes que desarrolle la inflorescencia (Siegel, Latch y Johnson, 1985).

En el caso de los endofitos no sistémicos, que infectan nuevas plantas mediante esporas, su penetración hifal puede ser por estomas (O'Donnell y Dickinson, 1980) desarrollando micelio intercelular entre las células del mesófilo, por heridas o intracelularmente en células de la epidermis. Estas son infecciones localizadas, de poca extensión.

Fisher y Petrini (1987) y Fisher et al. (1987) hallaron endofitos en Suada fruticosa y Pinus sylvestris que se instalan en tejidos internos (tejido xilemático) del hospedante. Otros, pueden ser muy superficiales, ubicándose subcuticularmente (Petrini y Muller, 1979). Estos autores consideran que en este último caso, el término endofito debe considerarse en sentido amplio.

Interacción hongo-hospedante

Carroll y Carroll (1978) postulan que los endofitos podrían comportarse como simbioses mutualistas.

Evidencias posteriores dan cuenta de la existencia de este mutualismo tanto en plantas leñosas (Carroll, 1986) como en pastos (Clay, 1986; Siegel et al. 1984 y 1987a,b).

El mutualismo puede definirse como una asociación estrecha entre miembros de especies diferentes que se benefician mutuamente (Cooke y Rayner, 1984).

Cooke (1977) sostiene que "un hongo puede ser considerado un simbiote neutral si es hallado en un hospedante del cual no es absolutamente dependiente, pero sobre el cual no tiene efectos deletéreos o beneficiosos....Algunos hongos endofitos posiblemente caen dentro de este grupo de simbioses neutrales sólo a causa de la falta de evidencias experimentales del posible efecto antagonista o mutualista sobre el hospedante"

En la evolución y desarrollo de los ecosistemas, la interacción antagonista está minimizada en pro de la supervivencia de las especies interactuantes, y el antagonismo está siendo reemplazado por algún tipo de cooperación (Odum, 1969 y 1971). En los hongos esta cooperación puede ser el mutualismo (Cooke y Rayner, 1984).

Gausse (1934) sostiene que el mutualismo no es parte de la lucha por la existencia, pero si una posible consecuencia de la misma.

Que una asociación simbiótica específica sea parasítica o mutualista, sólo puede determinarse por

comparación de las aptitudes de hospedante y hongo cuando viven solos, con la de ellos mismos cuando viven en asociación (Lewis, 1974).

Según Carroll (1988) las características que señalan la presencia de mutualismo entre los endofitos son:

1) el endofito es ubicuo en un hospedante dado sobre un rango geográfico amplio

2) causa síntomas mínimos de enfermedad en la planta hospedante.

3) la transmisión del hongo ocurre a través de la semilla del hospedante o de propágulos vegetativos. Si no ocurre la transmisión por semilla, la transmisión horizontal o lateral debe ser eficiente.

4) el hongo crece a través de los tejidos del hospedante. Si las unidades de infección están dispersas, entonces deben ser numerosas. Si están confinadas a un órgano determinado, una alta proporción debe estar infectada.

5) el hongo produce metabolitos secundarios probablemente de naturaleza antibiótica o tóxica.

6) el hongo muestra un patrón similar a conocidos endofitos mutualistas.

1) Beneficio para el endofito

Desde la perspectiva del endofito, la planta le provee de nutrientes y un lugar bien aislado. Su transmisión por semilla (en el caso de los pastos) lo hace menos dependiente de las condiciones ambientales para la dispersión de las esporas. Dentro del hospedante tiene asegurada su alimentación, supervivencia y diseminación (Johnson et al.1985).

Los organismos desarrollan preferencias alimenticias como mecanismo para evitar la superposición de nichos y la competencia entre aquellos que ocupan el mismo habitat físico (McNaughton y Wolf, 1979). En el caso de los endofitos, Carroll y Petrini (1983) plantean la existencia de dos grupos ecológicos:

1) aquellos asociados al pecíolo de la hoja, poseen amplio rango de utilización del sustrato, especialmente la celulosa. Pueden ser patógenos latentes capaces de penetrar las células vivas o descomponedores después de la muerte de la hoja.

2) aquellos con utilización restringida del sustrato, con alguna actividad sobre xilanos y pectinas, y poca celulolítica. Por lo tanto estos endofitos serían capaces de penetrar la hoja viva, y requerirían carbonos simples para su crecimiento.

Las zonas de la planta donde existen endofitos pueden actuar como destinos para la acumulación de N soluble

y carbohidratos (Bacon et al, 1986). Aquéllas sustancias pueden salir de la célula hacia el espacio intercelular donde serían tomadas por los endofitos. Estos utilizarían los desechos del metabolismo celular y asumirían funciones semejantes a las vacuolas excretoras (Widler y Muller, 1984). No se sabe si el endofito puede producir exudación de los productos vegetales o posee mecanismos para la traslocación de los mismos (Siegel et al.1987b).

II) Beneficio para el hospedante

1) Crecimiento

Evidencias experimentales y de observación sugieren que la infección por endofitos incrementa la adaptabilidad de algunas especies vegetales. Uno esperaría que las plantas infectadas vean reducido su crecimiento a causa del costo energético de soportar un simbionte heterotrófico, pero el crecimiento de las plantas infectadas indica que el beneficio es sustancial. Incluso plantas infectadas, donde el endofito causa esterilidad de la planta (caso de infección con miembros de la tribu Balansiae) pueden ser vigorosas vegetativamente y expandirse clonalmente aún en poblaciones mixtas (Clay, 1984 y 1988; Kelley y Clay, 1987).

En el caso de Lolium perenne y Festuca arundinacea, se encontró que la producción de semillas de plantas infectadas fue el doble que en el caso de las no

infectadas, y las semillas exhibían mayor poder de germinación (Clay, 1987).

En Festuca arundinacea, las plantas infectadas tienen mayor producción de retoños y exhiben resistencia a la sequía (Read y Camp, 1986), que las no infectadas. Esto puede representar una ventaja adaptativa sobre las no infectadas o sobre especies competitivas en ambientes con bajo contenido en agua y nutrientes (Belesky et al. 1987b y Clay, 1987).

Hasta el momento, se desconoce la base química para los cambios fisiológicos y de crecimiento de las plantas infectadas. Es posible que los hongos produzcan en la planta reguladores del crecimiento semejante a auxinas (Petrini y Muller, 1979) o sean capaces de alterar el metabolismo hormonal del hospedante (Siegel et al. 1987b y Belesky et al. 1987b).

La utilización por los endofitos de los nutrientes sobrantes, eliminados por las células, no perjudica a la planta e incluso podría contribuir a inhibir en el interior de la misma, la penetración de hongos patógenos, ya que los nutrientes necesarios para su crecimiento ya han sido consumidos (Widler y Muller, 1984). Esto sería análogo a los saprobios del filoplano que utilizan los exudados de la superficie foliar impidiendo así que éstos sean utilizados por patógenos foliares (Fokkema, 1981).

Muchos trabajos sobre endofitos postulan que la asociación entre endofito-hospedante influye sobre el comportamiento y fisiología de los herbívoros tanto en sistemas donde el hospedante es un pasto o un árbol (Clay, 1987 y Carroll, 1988).

Una posible razón de esta alteración en los herbívoros estaría basada en el cambio de la palatabilidad del vegetal. Las plantas que poseen endofitos pueden estar disminuidas en nutrientes comparadas con las plantas infectadas (Smith et al.1985). También la infección puede producir cambios físicos en los tejidos vegetales haciéndolos menos atractivos para los herbívoros (Webber, 1981). En otros casos, los endofitos producen toxinas con efectos drásticos sobre los herbívoros, pero mínimos sobre las plantas (Mantle 1969; Cheplick y Clay, 1988; Siegel et al,1987b).

Cubit (1974) observó que el talo del alga marina Enteromorpha_vexata, que crece a lo largo de las costas de Oregon, era consumida por un molusco marino durante el verano , a menos que el alga estuviese infectada con el endofito Turgidiosculum sp.

En 1975 y 1977 Bacon et al, registraron una asociación estrecha entre un endofito (Acremonium coenophialum Morgan-Jones y Gams) en Festuca_arundinacea y la incidencia de festucosis en ganado.

Fletcher y Harvey (1981) hallaron una asociación similar entre un endofito (A.lolii en Lolium perenne, y la enfermedad de temblequeo en el ganado (ryegrass stager). El nivel de infección de la planta con el endofito estaba en relación directa con la intensidad de la enfermedad. Estos dos ejemplos muestran el antagonismo hacia herbívoros, mediado por toxinas.

En plantas de Lolium perenne y Festuca arundinacea de Nueva Zelanda, Listronotus bonariensis (gorgojo argentino del tallo) deposita sus huevos en o cerca de la base de las plantas y luego hace un túnel en el retoño, destruyéndolo. Esto causa un gran perjuicio en las pasturas.

Prestidge et al (1982) y Barker et al (1983) observaron que las plantas aumentaban su resistencia al ataque del gorgojo si estaban infectadas por los endofitos A.lolii y A.coenophialum, respectivamente.

En el caso de Lolium perenne, Funk et al (1983) demostraron que la planta infectada con el endofito respectivo resiste el ataque de Crambus spp. (sod webworms)

En el caso de F.arundinacea, la presencia de A.coenophialum disuade al áfido Rhopalosiphum padi a alimentarse de ella y por lo tanto no se instala el virus enano de la cebada, que es llevado por el áfido (Latch et al. 1985).

En el caso de los árboles existen dos sistemas muy estudiados de relación hospedante-endofito-herbívoro:

2a) olmo-Phomopsis oblonga-Scolyptus spp. (coleóptero)

Los olmos sanos son atacados por Scolyptus, que se alimenta de las ramitas y construye galerías en la corteza del árbol. Este coleóptero lleva asociado a él, esporas de Ceratocystis ulmi, agente causal de la enfermedad del olmo.

Por otra parte, P.oblonga abunda en las capas internas de la corteza del olmo, donde existe como micelio latente (Webber y Gibbs, 1984). Desde allí puede invadir tejidos más internos y llegar hasta el floema, antes que la corteza sea invadida por Scolyptus (Webber y Hedger, 1986).

Una vez que la corteza tiene micelio de P.oblonga, y C.ulmi es introducido en ella, el crecimiento de este último se ve restringido por la competencia por nutrientes con P.oblonga (Webber y Hedger, 1986). P.oblonga actúa así como control biológico natural de la enfermedad del olmo, no sólo porque excluye a C.ulmi, sino también porque causa reducción sustancial de la cría y población de Scolyptus spp (Webber, 1981).

El olmo que contiene el endofito P.oblonga, no está protegido del ataque del coleóptero, ni de la infección con C.ulmi. El beneficio de la asociación es para la población del hospedante, pues como la población de

Scolyptus está disminuida, con ella también disminuye la posibilidad de infección con C. ulmi (Carroll, 1986).

2b) sistema abeto (Pseudotsuga menziesii)-Rhabdocline parkeri (endofito)-Contarinia spp. (díptero)

El díptero provoca grandes daños sobre plántulas y árboles jóvenes del abeto. Deposita sus huevos entre las hojas jóvenes de la yema, y las larvas móviles que emergen de ellos, hacen un agujero pequeño en el tejido hospedante y se meten dentro del mismo. Pasan un período alimentándose del tejido y formando una agalla, provocando caída de las hojas.

Los abetos pueden, además estar infectados con R. parkeri, que es dispersado por la lluvia, y cuyos conidios caen sobre las hojas de abeto, y una vez que germinan se instalan en las células epidérmicas. Las larvas en las agallas tienen altos niveles de mortalidad en presencia de R. parkeri. Experimentos que comparan la mortalidad larval en agallas infectadas con el endofito y en las no infectadas, muestran un porcentaje muy alto para las primeras (Carroll, 1986). Como el endofito no invade el cuerpo de la larva, se supone que las responsables de la mortalidad serían toxinas producidas por el hongo (Miller, 1986).

En la naturaleza, el árbol adulto infectado con el endofito sirve como fuente de inóculo para los árboles

jóvenes cercanos. El beneficio, también en este caso, es para la población y no para el individuo.

3) Resistencia a patógenos

Un ejemplo de este tipo de antagonismo lo constituyen las especies del género Lophodermium sp, que habitan en las hojas de Pinus sylvestris (pino Scot) (Minter, 1981).

Una de las especies, L.seditiosum, es patógeno de los árboles jóvenes, y causa caída prematura de la hoja. Otra especie, L.conigenum fructifica sólo después de que las hojas han muerto por la edad o por alguna otra causa.

El patógeno fructifica sobre las hojas en ramas caídas, si L.conigenum está ausente del bosque; pero si está presente, el patógeno queda excluido del habitat. La presencia de L.conigenum, reduce la fructificación y diseminación de L.seditiosum, y la infección por éste de los árboles de pino.

4) Bases químicas de la resistencia a herbívoros

Los hongos y las plantas han desarrollado una variedad de metabolitos secundarios (producidos durante el crecimiento no balanceado) que contribuyen a la supervivencia del organismo, defendiéndolo de competidores o predadores (Miller, 1986).

Los métodos de control biológico de ciertos patógenos vegetales, han involucrado a hongos toxicogénicos que producen sus toxinas en el filopiano del árbol (Cullen y Andrews, 1984).

Hay ejemplos de toxinas fúngicas producidas por endofitos:

4a) Toxinas en Festuca arundinacea .

Esta planta, conocida como festuca alta, es muy utilizada en pastizales de Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda y Australia. La primera referencia sobre su toxicidad para el ganado, proviene de Cunningham (1949) en Nueva Zelanda.

Numerosos trabajos indican la relación entre la presencia de endofitos en festuca alta y la toxicidad de la planta (Bacon et al. 1977; Fletcher y Harvey, 1981).

Las festucas infectadas con el endofito Acremonium coenophialum, producen en el ganado bovino una enfermedad conocida como festucosis, que causa en los animales pérdida de peso, disminución de la ingesta y de la producción de leche, excesiva salivación, incremento del ritmo respiratorio y altas temperaturas rectales. Este es el síndrome de verano. Pero también la enfermedad puede causar gangrena en las extremidades, pérdida de las pezuñas, etc., y es reconocida como pie de festuca ocurriendo generalmente en los meses de invierno.

La similitud entre el pie de festuca y el ergotismo, es la base para postular que sustancias vasoconstrictoras tales como ergoalcaloides, sintetizadas por la planta y/o el endofito, serían las responsables de este tipo de desorden.

Gran número de investigaciones dan cuenta de la existencia de diversos tipos de alcaloides en festuca alta (Davis et al. 1983; Lyons et al, 1986; Robbins et al., 1972).

Bush y Eurrus (1988) reúnen la información sobre los alcaloides hallados y los clasifican en tres grupos:

1) grupo diazafenantreno, con alcaloide predominante: la perlolina

2) grupo pirrolizidínico, con los alcaloides lolina y sus derivados N-acetil y N-formil lolina

3) ergoalcaloides con chanoclavina y ergopeptidos (ergovalina, el más importante).

La perlolina es uno de los alcaloides más abundantes en 5 variedades de Festuca sp., pero su contenido varía mucho con las condiciones ambientales (Bush et al., 1979) y existen dudas con respecto a su relación con el endofito. Buckner et al. (1973) indican que esta sustancia estaría bajo el control genético de la planta.

Strahan et al. (1987) y Bush y Burrus (1988) no encuentran diferencias en el contenido de perlolina entre plantas infectadas y no infectadas (tabla 1).

En cambio los niveles de N-acetil y N-formil lolinas muestran diferencias entre plantas con endofitos y aquellas que no los poseen (Jones et al., 1983). Esta relación entre presencia del endofito y existencia de las toxinas se halló también en semillas (Jackson et al., 1984; Neal y Schmidt, 1985).

Estas sustancias se encuentran en sistemas endofito-Festuca sp, pero se desconoce cual de los organismos las produce, o si es el resultado de una actividad sinérgica (Jones et al., 1983).

Por último, los ergoalcaloides (ergovalina) se encuentran en plantas infectadas y están ausentes en plantas no infectadas (Yates et al., 1985; Lyons et al., 1986). También este alcaloide se halla en cultivos del endofito (tabla 1) indicando que serían productos fúngicos.

Resultados experimentales sugieren que la concentración de ergoalcaloides puede incrementarse significativamente cuando las condiciones del hospedante favorecen la síntesis por el hongo de estos compuestos (Lyons et al., 1986).

Por lo que se conoce hasta ahora, la biosíntesis de ergoalcaloides está restringida a los hongos con la

Tabla 1. Compuestos producidos por *A.coenophialum*
en cultivo y/o por las plantas infectadas

Ergovalina	PI + cult.H
Ergovalinina	PI + cult.H
Ergosina	PI + cult.H
Ergonina	PI + cult.H
Chanoclavina	PI + cult.H
Agroclavina	PI + cult.H
Penniclavina	PI + cult.H
Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3	PI + cult.H
Elimoclavina	cult.H
Secoagroclavina	cult.H
Festoclavina	cult.H
Lolina	PI
N-acetil lolina	PI
N-formil lolina	PI
N-acetil norlolina	PI
Perlolidina	PI
Perlolina	PI + PNI

PI: plantas infectadas

PNI: plantas no infectadas

excepción de dos géneros de Convolvulaceae, y el endofito de festuca alta, es distinto a otros hongos por la particularidad de sintetizar preferentemente ergovalina.

Existen muchos trabajos sobre la toxicidad de festuca alta, pero la conclusión general de todos ellos, es que aún no se conoce qué o cómo, causa la toxicosis. Las sustancias tóxicas aisladas reproducen uno o algunos de los síntomas de la enfermedad, pero ninguna de ellas los reproduce en su totalidad. Se sabe que el endofito A.cenophialum está directamente relacionado, estimulando a la planta a producir la toxina o produciendo él mismo con la planta la sustancia (Bush y Burrus, 1988).

4b) Toxinas en Lolium perenne (raigrás)

El "temblequeo del raigrás" es un desorden neurológico en animales, mas comunmente ovejas, pero también en vacas, caballos y ciervos. Los animales sufren espasmos musculares, pérdida de peso y, en casos severos, caídas y muertes.

Esta enfermedad se produce principalmente en el verano y el otoño cuando las pasturas están en stress por la sequía.

El endofito más común es Acremonium lolii y el agente que se supone causa la enfermedad son las neurotoxinas lolitremos a y b, que se hallan en los pastos y semillas infectados con el endofito. Sin embargo en los

cultivos del hongo aún no se detectaron las neurotoxinas (Gallagher et al., 1982).

Los cortes histológicos de la planta infectada, observados al microscopio electrónico, muestran al endofito confinado a una zona extracelular. Su citoplasma contiene inclusiones cristalinas y agregados de túbulos (Fineran et al., 1983) mientras que el citoplasma del endofito en cultivo no los presenta (Harvey, 1985; Siegel et al., 1987 a).

Fineran et al. (1983) sugieren que estas inclusiones y agregados de túbulos podrían estar relacionados directa o indirectamente con la producción de las neurotoxinas.

Por otra parte, el hecho de que la enfermedad ocurra estacionalmente, sugiere que la producción de lolitremos sería estimulada por condiciones ambientales que podrían afectar la relación endofito-planta (Mortimer y di Menna, 1985).

Algunos investigadores (Gallagher et al., 1982; Harvey, 1983; Mortimer, 1983) sostienen que el hongo podría estimular al hospedante a producir lolitremos tanto por su presencia física como por medio de metabolitos que despertarían en él una respuesta del tipo fitoalexinas.

Gaynor et al (1983) y más recientemente Rowan et al (1986) hallaron en raigrás infectados con el endofito, una

sustancia con propiedades químicas diferentes a los lolitremos, peraminas (alcaloides) que parecen ser las responsables de la resistencia hacia los insectos herbívoros. Esto sugiere que la toxicidad hacia los mamíferos tiene diferentes orígenes químicos que la resistencia hacia los insectos (Clay, 1988).

III) Control del hospedante sobre el endofito.

Uno de los aspectos de la relación hongo-hospedante, tiene que ver con la regulación que ejerce este último sobre el crecimiento y desarrollo del endofito. Por ejemplo en el caso de *R.parkeri*, endofito del abeto Douglas, su infección es de tipo epidérmico, intracelular, y la hifa ocupa totalmente la luz de la célula infectada. Cuando el hospedante senesce (hojas), las hifas del endofito comienzan a colonizar mediante haustorios, las células adyacentes, es decir, las células guardianas y mesofílicas, pudiendo formarse uno o más haustorios a partir de una misma hifa. Todo este proceso ocurre dentro de las semanas previas a la abscisión de la hoja. Después de la abscisión, la colonización y esporulación del endofito ocurre rápidamente (Stone, 1987).

En el caso de los endofitos algales, la hifa en la célula algal viva es muy delgada, y se halla limitada entre las paredes celulares del hospedante, cuando la célula algal muere, la hifa endofítica se expande hasta un diámetro cinco veces mayor que el inicial (Porter, 1985).

Como último caso podemos analizar la pudrición causada por Colletotricum gloeosporioides Penz, en frutos de palta. El examen anatómico del fruto muestra que el hongo se encuentra en forma de apresorios entre la capa cética y la cutícula del fruto inmaduro, unido al árbol (etapa endofítica?)

Durante la maduración del fruto fuera del árbol, el apresorio desarrolla un tubo de infección que penetra la cutícula y epidermis. Más tarde, las hifas invaden la piel y la pulpa, causando la pudrición del fruto (Binyamini et al., 1972).

Si analizamos estos tres ejemplos, observamos que cuando el hongo está en relación con los tejidos vivos del hospedante, su crecimiento es limitado, pero cuando el tejido hospedante muere, el endofito se expande y es capaz de aumentar su biomasa (Miller, 1986). Este control puede resultar de insuficiente producción de enzimas por el hongo para invadir el fruto inmaduro (Schulz, 1978); de requerimientos nutritivos del patógeno que sólo son suministrados en la maduración del fruto (Verhoeff, 1974); o de la presencia de compuestos antifúngicos en el fruto inmaduro que inhiben el desarrollo fúngico. En este sentido Prusky et al., (1982) hallaron un compuesto antifúngico en la piel de los frutos inmaduros de palta que inhibe in vitro el crecimiento de C.gloeosporioides.

Inoculación artificial

Muchos pastos y ciperáceas están infectados por hongos sistémicos de la tribu Balansiae. Las infecciones de estos hongos están asociadas con cambios sorprendentes en el crecimiento del vegetal, reproducción, toxicidad a insectos y mamíferos herbívoros. Aunque la mayoría de los hongos causan esterilidad en sus hospedantes y producen cuerpos fructíferos durante la floración, otro grupo similar causa infecciones sin aquellos síntomas y es transmitido por crecimiento vegetativo de la hifa en las semillas. Estos últimos son endofitos anamórficos clasificados dentro del género Acremonium spp.

Se han realizado numerosos intentos para inocular artificialmente hongos de la tribu Balansiae en pastos, pero sólo unos pocos han resultado exitosos. Diehl (1950) trató una variedad de métodos incluyendo suspensión de esporas sobre tallos, hojas e inflorescencias; inyección de conidios y micelios en tallos, y cepillado de conidios sobre estigmas. Tuvo poco éxito, sólo tres de las 20 plantas de Cenchrus echinatus L. originadas a partir de semillas de una planta madre cuyos estigmas fueron inoculados con conidios de Balansia, produjeron estromas.

Western y Cavett (1959) infectaron Dactylis glomerata con ascosporas y conidios de E.typhina sobre superficies cortadas del rastrojo, y Mühle y Frauenstein (1970) inocularon plántulas de Phleum pratense L. con

micelio de E.typhina. En ambos casos las plantas desarrollaron estromas al año siguiente.

Intentos para inocular otros hospedantes tuvieron éxito (Rykard et al,1985).

Recientemente Latch y Christensen (1985) realizaron infecciones artificiales en Lolium perenne L. y Festuca arundinacea Schreb. con cinco endofitos, incluyendo tres anamorfos de Balansiae. Ellos insertaron micelio con un escalpelo en la unión de mesocotile y coleoptile de plántulas en cultivos estériles. y comprobaron que es posible infectar plántulas de Lolium perenne, Festuca arundinacea y F.rubra, con endofitos aislados de otros hospedantes.

Posteriormente Leuchtman y Clay (1988) lograron infectar especies de Danthonia spicata, Stipa leucotricha y Cyperus virens, con cepas de Atkinsonella hypoxylon y Balansia cyperi, inoculando micelio y conidios con una aguja en el meristema. El hongo crece en las plántulas, y posteriormente produce estromas, completando así su ciclo de vida a partir de la infección.

En el caso de A.hypoxylon, hay cepas que pueden infectar sus hospedantes naturales, y no otros, sugiriendo que existen razas del hongo para cada hospedante.

Si las plantas pueden ser infectadas con endofitos y sobre hospedantes distintos de los naturales, esto puede tener aplicación en nuevos cultivares de pastos y otras

plantas, y lograr beneficio en el crecimiento de la planta y en la resistencia a los herbívoros.

Bacon (1988) comprueba que la capacidad de síntesis de ergocalcoides por algunos endofitos, se pierde con la edad de los cultivos, mientras que otras condiciones fisiológicas son más permanentes. Si pudiesen lograrse cultivos que no produzcan los alcaloides y si mantuviesen sus mecanismos de resistencia hacia las plagas, tales aislamientos una vez reinoculados en las plantas podrían mejorar la calidad agronómica de las mismas.

En la naturaleza las plantas con endofitos pueden tener una ventaja selectiva sobre aquéllas que no los poseen, pero puede ser una desventaja en el caso de presión de selección por el hombre que favorece a las plantas no infectadas, sobre las infectadas, cuando está involucrado el ganado. (Siegel et al.1984).

Evolución

Evidencias químicas, morfológicas y de hospedante sugieren que los endofitos de pastos han evolucionado a partir de un antecesor patógeno semejante a Claviceps, donde los cambios evolutivos han implicado:

1) cambio de parásitos que se desarrollan sobre los ovarios (Claviceps) a endofitos sistémicos (tipo

Balansiae y Acremonium sp.) que se presentan en todo el tejido hospedante.

2) plantas con hongos tipo Claviceps, donde los alcaloides producidos están localizados en una zona de la planta, a endofitos sistémicos productores de alcaloides, que se encuentran distribuidos en toda la planta e interfieren con los insectos herbívoros.

3) transición desde provocar la esterilidad del hospedante (Claviceps) hasta recuperación de la fertilidad, cuando el endofito es transmitido vía semillas de las plantas que florecen normalmente. En general se considera que los endofitos son especies hermanas de parásitos virulentos que se hallan sobre el mismo hospedante o en hospedantes taxonómicamente cercanos. Por ej: en pino, las especies Lophodermium pinastri y L.conigenum, están sobre el mismo hospedante que el patógeno L.seditiosum (Minter et al, 1978).

También en el abeto Douglas, R.parkeri está en relación con otros patógenos R.wierri y R.pseudotsuga. (Parker y Reid, 1969; Stone, 1986).

Algunos patógenos pasan a través de una fase de crecimiento asintomático en el hospedante antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad (Kulik, 1984) y también pueden existir endofíticamente en malezas cercanas de las plantas de las cuales son patógenos (Hepperly et

al,1985). En otros casos los endofitos pueden causar síntomas patógenicos solamente si el hospedante esta estresado (Millar 1980 y Andrews et al, 1985). Estos casos representarían estados de la evolución entre la forma patógena y la endofítica.

Barrett (1983) ha presentado una sinopsis de la literatura existente que demuestra casos de coevolución entre los patógenos y las plantas hospedantes. Si los endofitos han evolucionado de patógenos, es posible suponer que plantas y endofitos pueden haber coevolucionado.

La comparación entre la taxonomía del endofito y del hospedante, sugiere que en los casos de especificidad endofito-hospedante, puede haber existido una coevolución, pero en los otros casos donde los endofitos no tienen preferencia por el hospedante, no se ajustaría a este tipo de evolución.

Con respecto a la evolución del mutualismo endofítico, podríamos preguntarnos si ocurrió una sola vez, y produjo entonces líneas endofíticas muy antiguas, o si hubo varios orígenes diferentes.

Al observar los grupos taxonómicos a los que pertenecen los endofitos (Loculoascomycetes, Discomycetes, Pyrenomycetes) parecería difícil imaginar un único origen del habitat endofítico. Lutrell (1974) sostiene que los patógenos de plantas han evolucionado en diferentes

momentos, sobre diferentes plantas. Si esta idea es correcta y si los endofitos derivan de los patógenos, el habitat endofítico debe haber surgido entonces en diferentes momentos.

En los casos de endofitos que se transmiten través de la semilla y producen una infección de tipo sistémico, dando origen a un mutualismo de tipo constitutivo, la selección natural opera sobre los individuos, y la simbiosis tiene beneficios para los dos individuos involucrados.

En el caso de endofitos que se transmiten por esporas, y producen una infección de tipo lateral, originando un mutualismo de tipo inducible, los beneficios son menos claros. En los ejemplos del sistema olmo-R.oblonga-Scolyptus sp. y del abeto Douglas-R.parkeri-Contarinia sp, el árbol infectado con el endofito y el coleóptero (primer caso), o el endofito y el díptero (segundo caso), no sobrevive, pero la presencia del endofito logra disminuir el número de la progenie de los insectos, y con ello la probabilidad del ataque a los árboles jóvenes vecinos. Esto muestra el beneficio para la población y no para los individuos.

La evolución de tales asociaciones puede ser entendida en términos de "kin selection", una forma de selección génica donde los individuos que comparten una alta proporción de los mismos genes, pueden comportarse

altruístamente (Wilson, 1983) respecto de otros individuos que resultan beneficiados.

OBJETIVOS

Las investigaciones llevadas a cabo hasta el presente, sugieren que los endofitos fúngicos integrarían una asociación mutualista con las plantas. En este trabajo nuestro objetivo es aportar datos que avalen este posible papel de los endofitos fúngicos en la naturaleza. En este sentido, nos planteamos diferentes objetivos parciales:

1) estudio de la estructura de la comunidad

Este estudio nos permitirá conocer si los endofitos fúngicos conforman una comunidad organizada o se trata meramente de organismos asociados incidentalmente con la planta. Por otra parte, se tratará de determinar el modo de infección y colonización de estos organismos y su localización en los tejidos del hospedante (hospedante: Eucalyptus viminalis)

2) colonización por endofitos según el ciclo de vida del hospedante.

Se plantea la hipótesis de que las plantas perennes, que tienen menor posibilidad para reaccionar ante cambios del ambiente, presentarían una mayor asociación con endofitos fúngicos, que las plantas anuales (hospedante: Juncus spp.)

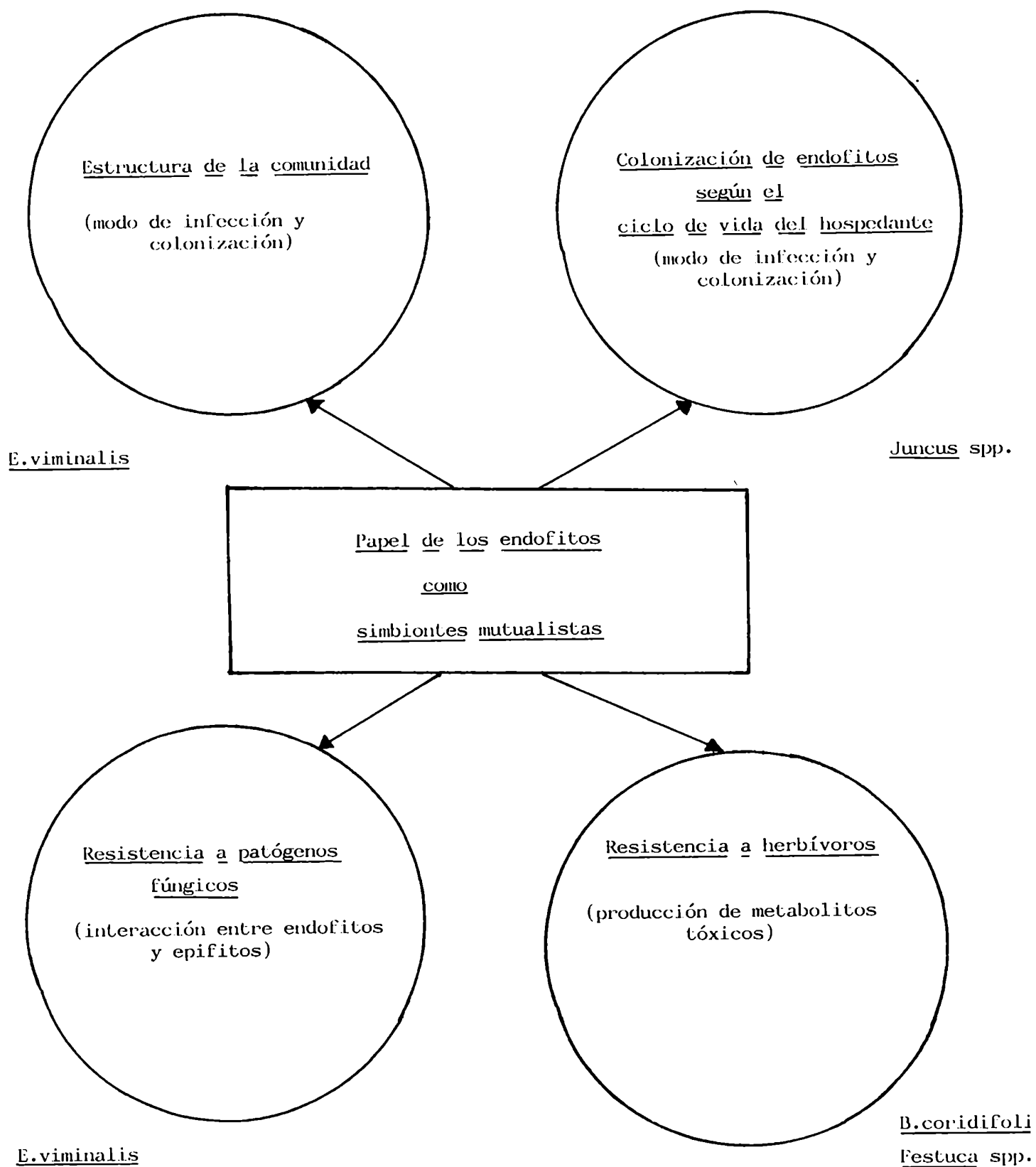
3) participación de los endofitos en la resistencia de las plantas a los patógenos fúngicos

Si los endofitos fungicos se comportasen como simbioses mutualistas presentarían una interacción activa con potenciales patógenos fúngicos de la planta. Los resultados de esta interacción podrían ser el factor organizador de la comunidad (hospedante: E.viminalis)

4) Participación de los endofitos en la resistencia de la planta a los herbívoros

Como señalamos anteriormente, las plantas infectadas con endofitos presentan resistencia al ataque de herbívoros, y esta parece estar mediada por sustancias tóxicas. En este sentido, estudiaremos la presencia de endofitos en dos hospedantes: Baccharis coridifolia y Festuca spp., con el fin de correlacionar dicha presencia con la toxicidad de estas plantas para los herbívoros.

Lámina II
Síntesis de los objetivos planteados



CAPITULO I

ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD ENDOFITICA

(en Eucalyptus_viminalis)

Las investigaciones llevadas a cabo sobre los endofitos, han mostrado que estos organismos están ampliamente distribuidos en una variedad de plantas. Las familias de plantas más estudiadas en cuanto a la presencia de endofitos son: Cupressaceae, Pinaceae, Ericaceae y Graminae, y estos estudios se han realizado sobre hospedantes de Europa, Estados Unidos y Nueva Zelanda.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la presencia de endofitos en hojas de E.viminalis, en plantaciones de nuestro país, con el fin de conocer la estructura de la comunidad de estos organismos, su modo de infección o transmisión, y su localización en las distintas zonas de la hoja.

Materiales_y_métodos

Las muestras se tomaron en un stand de E.viminalis localizado en Ramallo, provincia de Buenos Aires, perteneciente a la firma Fiplasto S.A. (Cabral, 1982). Estos árboles crecieron a partir de un stock mixto de semillas. El

ensayo preliminar se realizó en mayo de 1982, con el fin de probar el método de análisis y determinar cuál es el tiempo de permanencia de las hojas en el árbol. De este ensayo resultó que el tiempo de vida de las hojas, es de 14 meses.

El muestreo definitivo se llevó a cabo en agosto de 1982 y en mayo de 1983. En cada muestreo se eligieron al azar tres árboles y de cada uno de ellos se retiró una rama. Las ramas se mantuvieron en bolsas de polietileno a 6 °C hasta el procesamiento. De cada rama se sacaron tres hojas, con peciolo y con sectores de ramitas vecinas a las hojas, a la izquierda y derecha de la mismas. Las hojas fueron elegidas según la clase de edad. Consideramos como hoja joven, la primer hoja cercana a la yema apical de la presente estación ; la última hoja de la misma estación se consideró como madura 1 (M_1), y el grupo de hojas de la estación de crecimiento anterior, como madura 2 (M_2). Las hojas senescentes y secas no fueron consideradas, pues en ellas la frecuencia de endofitos es baja (Cabral, 1985; Bertoni y Cabral, 1988).

Las hojas y las ramas fueron humedecidas (durante 1 min.) en alcohol etílico 96%, esterilizadas en $HgCl_2$ 0,1 % p/v, (2 min.) y luego lavadas en agua estéril (1 min.), en tres cambios.

Con el fin de comprobar la distribución de los endofitos, una mitad de la hoja, incluyendo la nervadura, fue cortada en su totalidad en cuadrados de 3 mm de lado.

Resultó así un mapa de la hoja, donde se consideró separadamente a lámina, nervadura y pecíolo.

Las submuestras fueron cultivadas en medio de Cooke (1954) con 35 mg/l de Rosa de Bengala, y mantenidas a temperatura ambiente (22-27 °C) con luz diurna. El aislamiento de los hongos se realizó en tubos de ensayo con medio de extracto de malta al 2%.

Anatomía de la hoja

Con el fin de correlacionar la infección endofítica con las características morfológicas de la hoja, se realizaron cortes histológicos seriados con micrótopo de deslizamiento, de la porción basal y apical. También se calculó el número de estomas por cm² sobre hojas previamente clarificadas, en la cara adaxial y abaxial de la mismas. Para el recuento de los estomas se utilizó un cuadrado de 9x9 cm sobre el que se superpuso, mediante cámara clara, el campo visual del microscopio y el material con los estomas. Se tomaron en cuenta aquellos estomas que aparecían dentro del cuadrado y los que intersectaban el borde en dos lados del mismo.

Observación directa de los endofitos

La localización de los endofitos dentro de la hoja, fue observada mediante la clarificación de las mismas y posterior tinción del micelio. Para ello se trató a la hoja fresca con HOK 10% en estufa de 60-90 °C durante 1 día-

lsemana. Luego fueron lavadas sucesivamente en HOK fresco y en agua; acidificadas con CLH diluido, y teñidas con chlorazol black E o trypan blue.

Por otra parte, hojas fijadas en FAA, fueron herbidas durante unos minutos y luego cortadas utilizando micrótomo de deslizamiento. Los cortes fueron clarificados con HOK 10% , lavados con agua y teñidos con los colorantes antes indicados.

Análisis estadístico

Las frecuencias totales de infección se obtuvieron dividiendo el número total de segmentos infectados por el número total de segmentos incubados, por cien. El mismo método se utilizó para calcular la frecuencia de infección para cada una de las edades consideradas. Se registró la frecuencia de infección a) de la hoja en su totalidad, b) del peciolo, lámina y nervadura separadamente y c) de la mitad apical y basal respectivamente. También se calculó la frecuencia de infección para cada especie en los casos a), b) y c).

Utilizando la flora endofítica como indicador, se calculó el coeficiente de similitud entre las diferentes hojas de acuerdo al coeficiente de Czekanowski (1931). Este coeficiente se calcula como:

$$s:2w/a+b$$

donde s : coeficiente de similitud

a : suma de las frecuencias de las especies fúngicas sobre la hoja 1

b : suma de las frecuencias sobre la hoja 2

w : suma de las frecuencias de las especies comunes a la hoja 1 y 2.

Los resultados fueron agrupados por el método de clasificación aglomerativa WFGM (Sokal y Sneath, 1963).

Para comparar las frecuencias de infección en los casos a), b) y c), se usó el test de Chi-cuadrado.

Resultados

Frecuencia de infección

Las tablas 2 y 3 muestran la frecuencia de infección en la lámina, nervadura y peciolo, con respecto a la edad de la hoja. Las diferencias entre lámina y nervadura son significativas, no así entre nervadura y peciolo.

Si las submuestras son agrupadas en la mitad apical y basal de la hoja, el test de Chi-cuadrado muestra que la zona apical (41,5%) tiene significativamente menos endofitos que la zona basal (49%, tabla 4).

Tabla 2 Números de submuestras infectadas en lámina, nervadura y peciolo, con respecto a la edad de la hoja

	J		M ₁		M ₂	
	Pr	A	Pr	A	Pr	A
L	50	268	295	176	267	78
N	11	158	88	157	81	106
P	2	26	6	18	5	18
Total	63	452	389	351	353	197

Pr: presencia A: ausencia L: lámina N: nervadura
P: peciolo

Tabla 3 Test de Chi-cuadrado

	L vs. N	N vs. P	J vs. M _s	M ₁ vs. M ₂
	8.24* (J)	0.01 (J)	303*	16.8*
X ²	46* (M ₁)	1.05 (M ₁)		
	66.7* (M ₂)	3.9 (M ₂)		

* significativo (p < 0.005)

Tabla 4 Números de submuestras infectadas en la zona apical y basal de la hoja

	Pr	A	
Z.apical	307	431	
Z.basal	486	506	X ² : 9.25
Total	793	937	significativo (p < 0.005)

La frecuencia de infección varía con la edad de la hoja, significativamente entre M_1 y M_2 , y más entre J y M_2 (M_1+M_2 ; tabla 3). Este incremento de infección con la edad de la hoja coincide con los resultados hallados en otras especies vegetales (Bernstein y Carroll, 1977; Petrini y Muller, 1979; LungibUhl y Müller, 1980; Petrini y Carroll, 1981 y Todd, 1984; Stone, 1987).

Frecuencias de infección de las especies y su distribución

La tabla 5 muestra las frecuencias de infección de las especies en la lámina, nervadura, peciolo y rama. Las siguientes especies fueron halladas en todas las estructuras mencionadas: Coniothyrium sp., Coccomyces martiniae, Macrophoma smilacina, Micelio estéril GRN, Alternaria sp., y Mycosphaerella sp. (esta última no en ramas); mientras que Zoellneria eucalypti, Chaetomium sp., Sporormiella minima, Pestalotiopsis oxyanthi, Pleospora herbarum y Hormonema sp. se hallaron sólo en la lámina.

La lám.III muestra la infección interna en 6 hojas y ramas adyacentes a las hojas, según el método de mapeo foliar. En cada una de ellas están indicadas las submuestras con la/las especies endofilas halladas y la distribución de las diferentes especies en cada una de las hojas. De la observación de estos mapas foliares surge que la

Tabla 5 : Frecuencias de las especies aisladas (%) de lámina, nervadura, peciolo y rama

	joven J			Madura M ₁			Madura M ₂			R
	L	N	P	L	N	P	L	N	P	
	<i>Coniothyrium</i> sp.	1.1	0	2.3	16.5	14.4	8.3	15.2	7.6	
<i>Nigrospora</i> sp.	3.1	1.3	0	2.2	1	0	5.3	0.7	0	0.2
<i>Mycosphaerella</i> sp.	0.3	0	0	10.6	3.2	5.5	32.5	12.4	0	0
<i>Coccomyces</i> martiniae	3.7	2.6	0	23.5	9.9	2.1	28.3	16.4	0	0.1
<i>Macrophoma</i> smilacina	1.2	1.3	2.3	5.5	3.2	12.5	7.3	3.7	7.5	4.6
<i>Zoellneria</i> eucalypti	0.2	0	0	0.7	0	0	0.4	0	0	0
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0
<i>Sporormiella</i> mínima	0.3	0	0	0.3	0	0	0.6	0	0	0
Micelio esteril GRI	0.8	0	0	2.4	1.2	0	3.1	2.8	8.3	0.5
<i>Alternaria</i> sp.	2.2	0	0	1.5	0.6	0	0.6	0.7	4.1	1.3
<i>Pestalotiopsis</i> oxyanthi	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	0	0.2	0	0	0.1	0.4	0	0
<i>Pleospora</i> herbarum	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0
<i>Hormonema</i> sp.	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0
Micelio esteril	0.4	0	0	1	1.3	0	0.1	0.7	0	0
∑ frecuencias	13.3	5.2	4.6	64.8	34.8	28.4	94.3	45.4	25.4	7.9

distribución de las especies fúngicas no sigue ningún patrón reconocible, más bien se presenta al azar y en forma discontinua.

Similitud de infección entre hojas

En la tabla 6 observamos la frecuencia de infección de las especies en 18 hojas de 6 árboles. Si aplicamos el coeficiente de similitud de Czekanowski obtenemos la matriz de coeficientes de la lám. IV. Al agrupar estos coeficientes según el método de clasificación aglomerativa WFGM se obtienen las restantes 16 matrices. De los resultados de estas matrices se obtiene el dendrograma del gráfico 1, que presenta 5 grupos de similitud: 1) formado por las hojas 5, 17 y 18 (clases de edad M_1 y M_2); 2) formado por las hojas 2, 6 y 8 (clases de edad M_1 y M_2); 3) formado por las hojas 4, 7 y 11 (clases de edad J y M_1); 4) formado por las hojas 3, 9, 14 y 15 (clases de edad M_1 y M_2). El 5to grupo de baja similitud, está formado por las hojas 1, 10 y 16 (clases de edad J). Las hojas 12 (clase de edad M_2) y 13 (clase de edad J) aparecen apartadas del resto y con un coeficiente de similitud muy bajo.

Al comparar los grupos del dendrograma con los datos de la tabla 6, observamos que cada grupo está formado por hojas de diferentes árboles, con la excepción del grupo

Lámina III. Diagramas de las hojas jóvenes (J), maduras M_1 y M_2 según el método de mapeo foliar. En cada hoja están indicadas las submuestras con los endofitos aislados.

R_1 : rama a la izquierda de la hoja

R_2 : rama a la derecha de la hoja

P: pecíolo

N: nervadura

■ Coniothyrium sp.

▨ Mycosphaerella sp.

▧ C.martiniae

▩ S.m.GRN

▪ M.smilacina

▬ Alternaria sp.

▭ Zeucalypti

▩ S.mínima

■ Nigrospora sp.

Lámina III . Hojas juvenes (J)

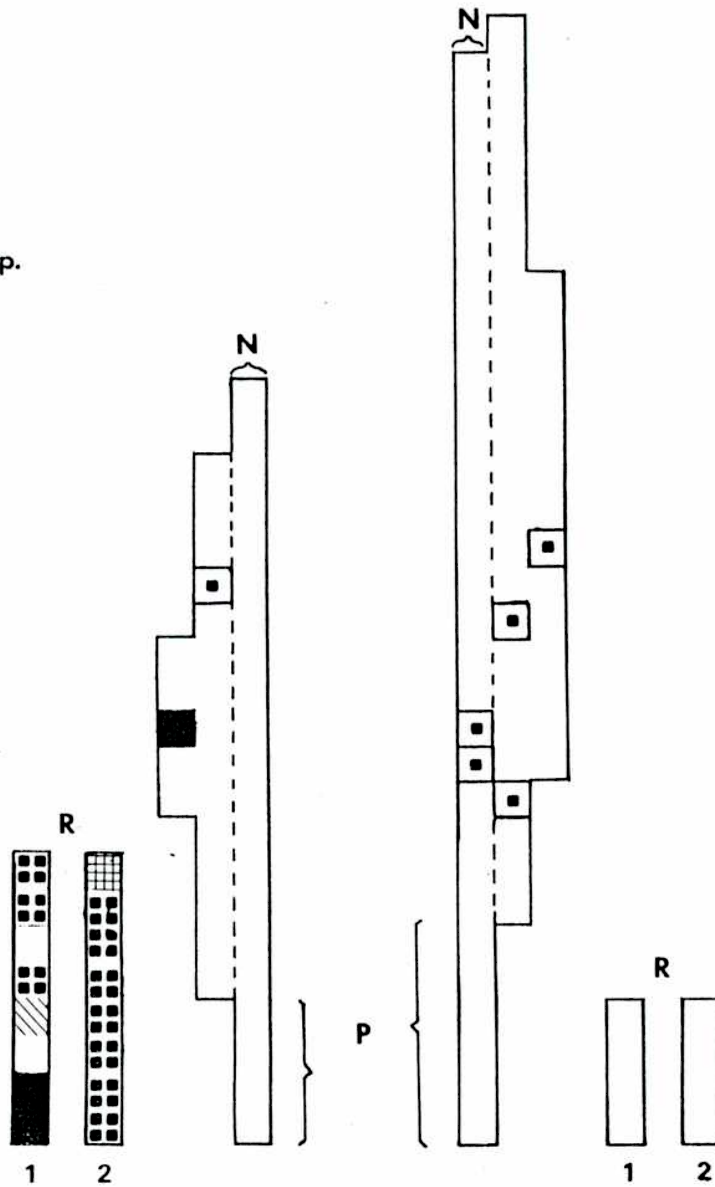


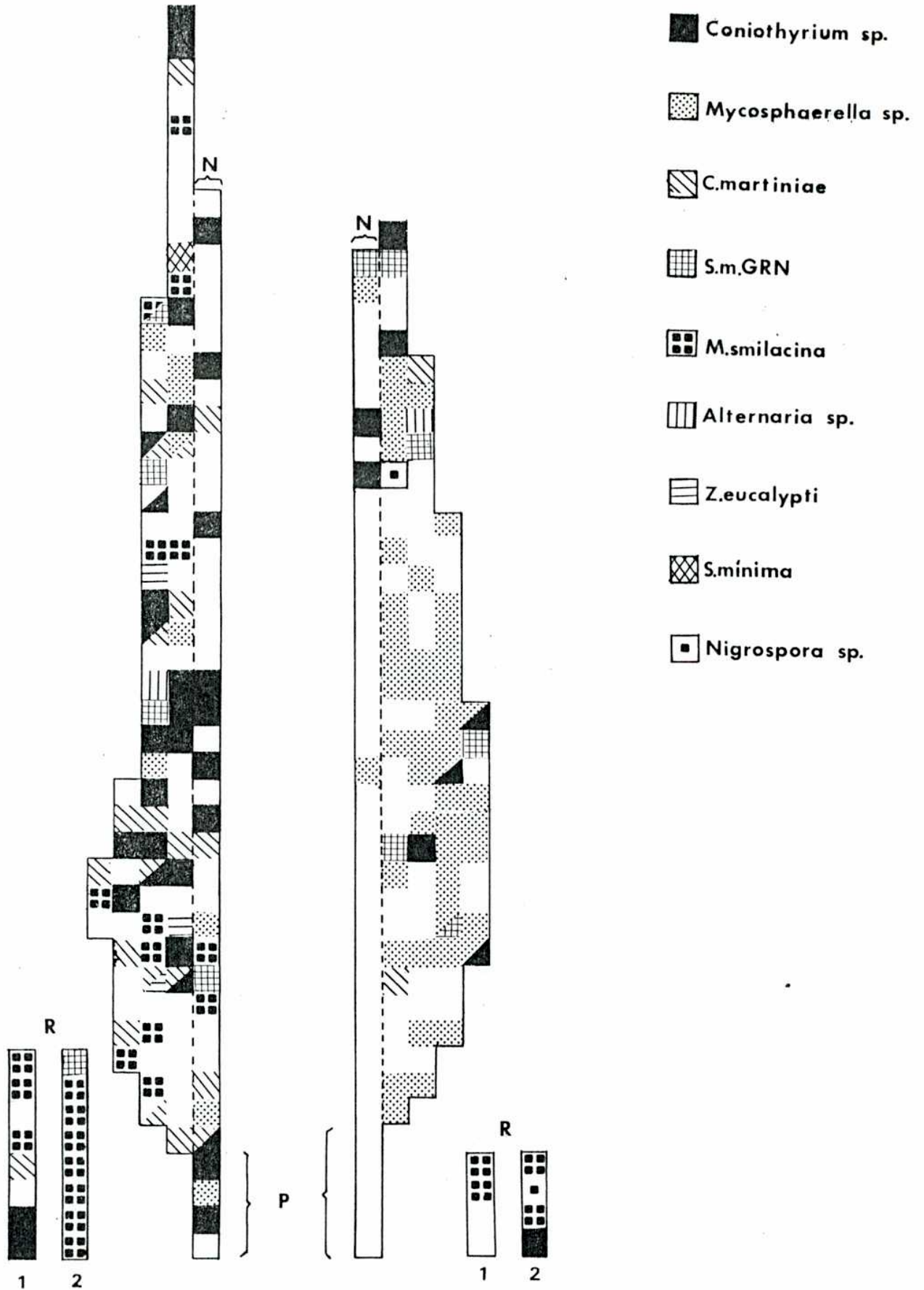
Lámina III (cont.). Hojas maduras (M_1)

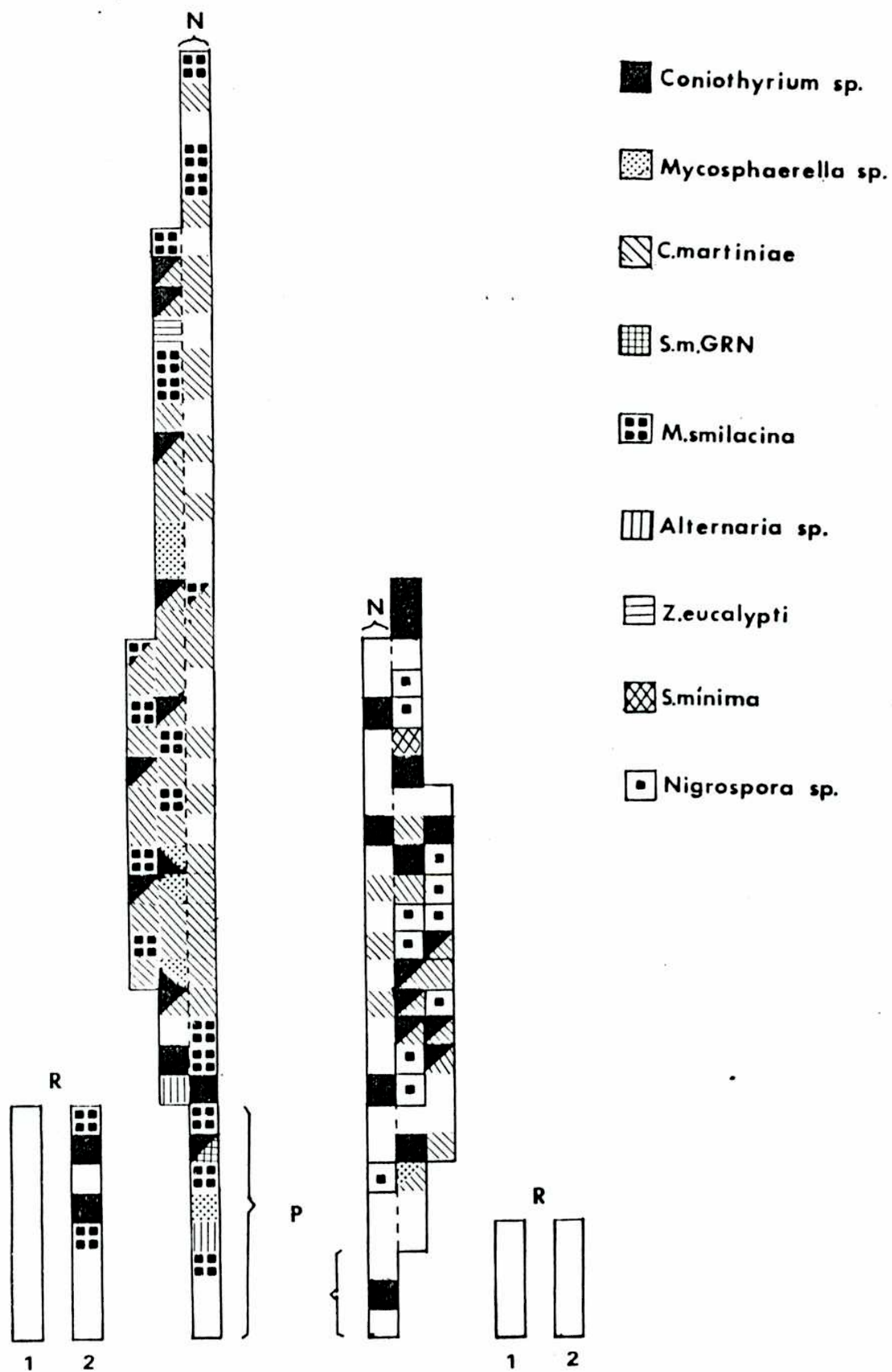
Lámina III (cont.). Hojas maduras (M_2)

Tabla 6: Frecuencias de las especies (%) con respecto a la edad de la hoja

Arbol	1			2			3			4			5			6		
	J	M ₁	M ₂	J	M ₁	M ₂	J	M ₁	M ₂	J	M ₁	M ₂	J	M ₁	M ₂	J	M ₁	M ₂
Coniothyrium sp.	2.6	23.4	20.7	0	14.7	14.6	1	34.1	6.5	0	0	1.6	2.3	6.4	0	0	17.5	28.8
Nigrospora sp.	2.6	0	1.8	0	2.1	0	1	2.2	0	1.3	0	1	0	1	0	8	5.8	19.2
Mycosphaerella sp.	0	7	66	0	1	7.3	0	7.4	35.2	0	0	0	1.5	30.4	40.9	0	0	1.7
Coccomyces martiniae	0	16.4	0	10.9	12.6	56.1	8.6	40.7	32.1	0	19.6	44.8	1	1.6	0	0	22.5	26.3
Macrophoma smilacina	0	10.1	1.8	2.1	1.4	21.9	3.2	17	9	0	1.5	2.4	3	0	3.4	0	2.5	0
Zoellneria eucalypti	0	2.3	0	0	1	1.2	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chaetomium sp	0	0	1.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sporormiella minima	0	1	0	1.1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1.7
Micelio estéril GRN	0	3.9	5.6	0	0	1.2	0	3.7	6.5	0	0	0	2.3	4.8	9.1	0	0	0
Alternaria sp.	0	1	1.8	1.1	0	2.4	0	0	0	0	4.5	0	6.8	1.6	1.1	1.6	1	0
Pestalotiopsis oxyanthi	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cladosporium sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6	0	0	0	0	1	0
Pleospora herbarum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.2	0	0	0
Hormonema sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Micelio estéril	0	1	1.8	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	4.8	0	1.6	0	0
Σ frecuencias	5.2	66.1	101.3	15.2	35.8	104.7	15.1	106.1	79.3	1.3	25.6	53.4	16.9	50.6	56.7	11.2	51.3	78.7

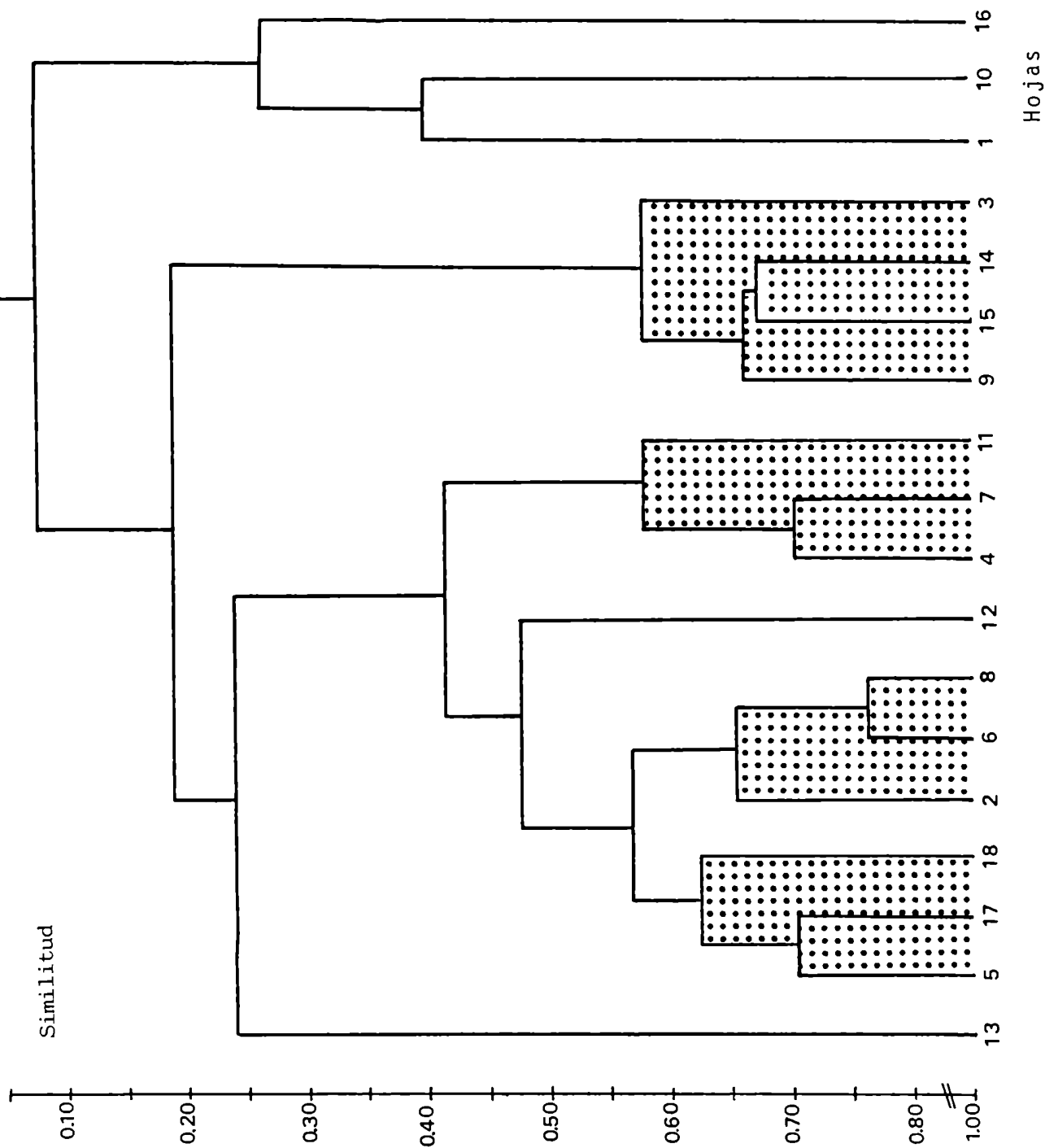
Gráfico 1

En el dendrograma de la derecha se observan

5 grupos de similitud (zonas punteadas):

- 1) hojas 5, 17 y 18 (M_1 y M_2)
- 2) " 2, 6 y 1 (M_1 y M_2)
- 3) " 4, 7 y 11 (J y M_1)
- 4) " 9, 15, 14 y 3 (M_1 y M_2)
y con baja similitud
- 5) hojas 1, 10 y 16 (J)

Graf.1 Dendrograma obtenido según WPGM (método de clasificación aglomerativa)



4, donde la máxima similitud ocurre entre dos hojas del mismo árbol.

Modelo de microcomunidades

Las hojas que integran cada grupo del dendrograma tienen en común 2 ó 3 especies que se presentan con frecuencias diferentes, y especies no comunes de baja frecuencia. Las especies comunes pueden estar indicando un tipo o modelo de microcomunidad (Swift, 1976), donde existen una a tres especies principales (de alta frecuencia) y especies secundarias (de baja frecuencia).

En la tabla 7 bosquejamos 4 modelos posibles de microcomunidades, donde las especies principales serían: Coniothyrium sp., C.martiniae, Mycosphaerella sp., y M.smilacina, que pueden aparecer solas (modelo P₃ y P₄), de a pares (P₁) o agrupadas de a tres (P₂). Las especies secundarias serían : Nigrospora sp., Micelio estéril GRN, Mycosphaerella sp., y M.smilacina. Estas últimas pueden ubicarse dentro de la microcomunidad como principales o secundarias.

Anatomía Foliar

Tabla 7 : Modelos de comunidades-unidades de endofitos
en hojas de *E.viminalis*

P_1		P_2	
Coniothyrium sp.	dominantes	Coniothyrium sp.	dominantes
C.martiniae		C.martiniae	
Nigrospora sp.		M.smilacina	
	secundaria	Mycosphaerella sp.	secundaria
P_3		P_4	
C.martiniae	dominante	Mycosphaerella sp.	dominante
M.smilacina	secundaria	Micelio estéril	
		GRN	secundaria

Las secciones histológicas seriadas de la mitad apical y basal de la hoja, y el número de estomas por cm^2 no muestran diferencias apreciables entre las zonas.

Observación de los endofitos

Los nódulos suberosos y los estomas, mostraron presencia de endofitos, indicando que la posible vía de entrada de aquéllos a la hoja podría ser a través de esas estructuras (lan. V, 1-4).

Discusión

De acuerdo con Bernstein y Carroll (1977) la infección foliar interna podría surgir de la infección sistémica a través de ramitas y peciolo; por micelio de hongos residentes sobre la superficie de la hoja, que penetran la cutícula o estoma; por infección múltiple de esporas; o por inoculación de insectos chupadores.

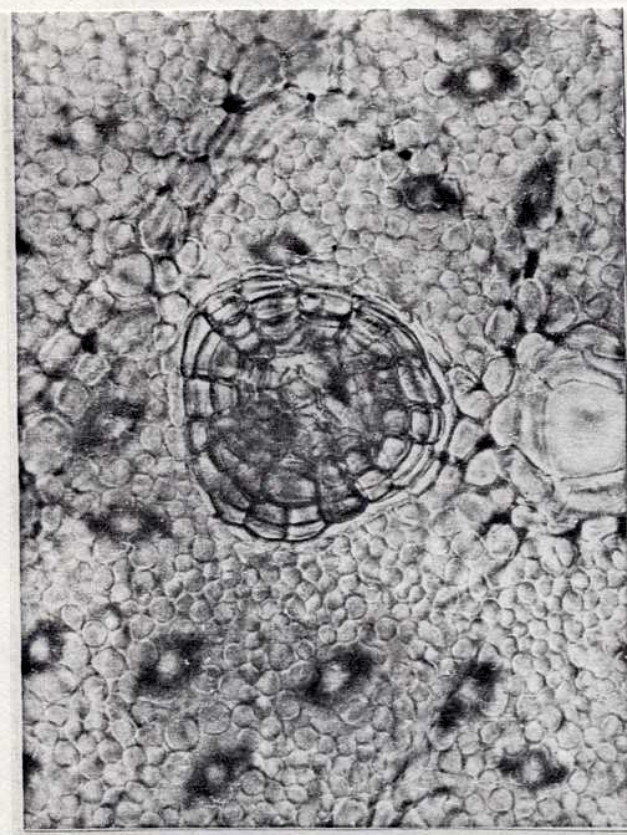
La presencia de ciertas especies en ramas, peciolo y hojas, sugeriría una infección sistémica a partir de la rama. Pero la discontinua distribución de las especies obtenida por el método del mapeo foliar, contradice esta hipótesis.

Según Carroll (1986) podríamos hablar de dos formas de transmisión endofítica:

Lámina V:

1. Cara superior de una hoja de E.viminalis donde se observa un nódulo suberoso (A:400x)
2. Interior del nódulo suberoso con micelio endofítico (A:1000x)
3. Corte longitudinal de un nódulo con hifas endofíticas (a)
(A:400x)
4. Detalle del estadio anterior (A:1000x)

Lámina V



1



2



3



4

a) donde el endofito es llevado a través de la semilla y está siempre presente en la línea materna del hospedante que lo lleva (ver introducción pág. 5).

b) el endofito se dispersa a partir de tejido senescente o muerto hacia la planta sana (ver introducción pág. 6).

En E.viminalis ocurriría el caso b), y la infección se produciría por medio de propágulos que caen sobre la hoja, germinan y luego penetran al interior de la misma.

El incremento de la infección con la edad de la hoja, podría ser el resultado de mayor tiempo de exposición de la hoja a los propágulos o relacionarse con cambios en el estado nutricional de la hoja y con la producción de exudados que favorecen la germinación y crecimiento de los propágulos (Miller y Roy, 1982).

Se han formulado varias hipótesis para explicar la preferencia de los endofitos por las distintas zonas de la hoja. El rocío y el agua de lluvia que permanecen en determinadas zonas durante más tiempo favorecería que se acumulen esporas, exudados y partículas de polvo (Pugh y Buckley, 1971) propiciando la germinación de las esporas.

La mayor disponibilidad de agua en la zona basal de la hoja de Juniperus communis (Petrini y Muller, 1979) o la protección que ejercen las catáfilas en Pinus taeda

(Venedikian, 1984) favorecen la infección de esta zona. En E.viminalis la mayor infección de la porción basal no puede ser explicada por diferencias en la disponibilidad de agua o anatómicas de la hoja con respecto a la apical. Suponemos que en este caso, la adherencia y crecimiento de los propágulos sería menor en la zona apical, ya que dos tercios de la hoja están pèndulos y son afectados por el viento, el drenaje del agua y la incidencia de la luz.

Las diferencias de frecuencia de infección entre lámina, nervadura y pecíolo, indicaría que la lámina es más favorable para el desarrollo de los endofitos. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el micelio sobre la superficie foliar está concentrado en las áreas de la lámina, principalmente en la depresión del estoma (Cabral, 1982 y 1985), y presuponiendo que la entrada en la hoja podría ser por los estomas o por los nódulos suberosos, la lámina estaría más infectada que la nervadura y el pecíolo.

La distribución de especies en la tabla 4 muestra dos grupos: aquéllas que se hallan presentes en todos los tejidos foliares, y aquéllas restringidas a la lámina, indicando la existencia de especies con capacidad bioquímica extensiva o restringida (Carroll y Petrini, 1983).

Especies tales como C.martiniae, Coniothyrium sp., M.smilacina, Z.eucalypti y Micelio estéril GRN son de alta frecuencia y fueron registrados como endofitos por Cabral (1985). En cambio P.exhyanthi, Nigrospora sp., Alternaria

sp., y Cladosporium sp. fueron considerados por Cabral (op.cit.) como hongos del filoplano.

De acuerdo con Riesen (1985) Alternaria sp y Cladosporium sp. sólo se comportan como endofitos para protegerse contra la deshidratación e irradiación, y pueden permanecer relativamente inactivos dentro de la hoja hasta que cambios en la fisiología del hospedante permita o estimule el crecimiento. Aquellos hongos penetrarían la hoja viva previo a su senescencia y continuarían luego como saprófitos cuando la hoja muere. Tal infección podría considerarse como latente (O'Donnell y Dickinson, 1980).

Las restantes especies de la tabla 4 no fueron registradas previamente sobre E.viminalis, pero sí como endofitos sobre los siguientes hospedantes: Fleospora herbarum en Arctastophylos uva-ursi (Petrini et al.1982) y sobre Triticum aestivum (Riesen 1985); Sporormiella minima sobre Glycine max (Miller y Roy, 1982), en Juniperus communis (Petrini y Müller, 1979) y sobre Triticum aestivum; Mycosphaerella sp., sobre Glycine max y sobre Juniperus communis, y Hormonema sp. sobre Juniperus occidentalis (Petrini y Carroll, 1981).

De acuerdo con Swift (1976), los sustratos vegetales se presentan como una serie de "unidades" (ramas, raíces, frutos y hojas) de tamaño y origen variable, cada uno con un conjunto particular de microorganismos. Tales comunidades, deben ser llamadas "comunidades-unidades" y

registradas como teniendo una integridad funcional y espacial. Del estudio de estas comunidades-unidades resultaría no sólo la lista de especies y su frecuencia de aparición, sino y más importante, una estimación de la estructura y función de la comunidad microbiana (Shearer y Lane, 1983).

La existencia de estas comunidades-unidades ha sido demostrada para comunidades microbianas de descomponedores, sobre sustratos tales como ramas (Healey y Swift, 1971) y hojas (Shearer y Lane, 1983). Nuestros resultados muestran que tal hipótesis puede ser extendida a la comunidad de hongos internos en hojas vivas.

Las microcomunidades en E.viminalis pueden representarse por 4 modelos de comunidad-unidad, que están esquematizados en la tabla 7.

Analizando el dendrograma del grafico 1, podemos observar 4 grupos (principalmente hojas maduras) con alto porcentaje de similitud, mientras que en el 5to.grupo, formado por hojas jóvenes, la similitud es baja. Esto indicaría que las microcomunidades se establecen en la edad madura, cuando se alcanza el equilibrio entre las especies infectantes.

La frecuencia de infección, y los modelos de comunidad-unidad de M_1 y M_2 sugieren que no existen cambios importantes en la comunidad-unidad dentro de la clase

madura. La inclusión de la hoja 4 y 7 de la clase joven, dentro de un grupo de alta similitud, probablemente sea el resultado de una errónea clasificación de la clase de edad.

Podemos también concluir que existen comunidades similares sobre hojas de árboles diferentes, indicando que un patrón dado de infección está presente en diferentes individuos y que no depende del genotipo del árbol. Si podría ser el resultado de la interacción de las especies en la escala de la comunidad-unidad (Shearer y Lane, 1983), como está representado en el modelo de la pág.106 de interacción de tres especies.

La variedad de modelos de colonización en las unidades del mismo recurso (hojas de E.viminalis) sugiere la existencia de nichos funcionales semejantes ocupados por especies diferentes, llamadas especies equivalentes. Por otra parte, una especie dada, puede formar parte de diferentes comunidades, como dominante o secundaria, indicando que puede adoptar roles fisiológicos diferentes.

CAPITULO II

COLONIZACION POR ENDOFITOS SEGUN EL CICLO DE VIDA DEL HOSPEDANTE

(en Juncus spp.)

Los insectos y las angiospermas han evolucionado interdependientemente uno del otro. La presión de selección ha actuado sobre ambos, a la vez que han surgido nuevos habitats.

Es así, que las plantas se han visto expuestas a una variedad de herbívoros, patógenos y animales, y en consecuencia han desarrollado mecanismos de protección, de naturaleza física y química, contra ellos.

Las plantas perennes, cuyo genotipo es fijo, y por lo tanto con pocas posibilidades de variar sus aleloquímicos durante un tiempo prolongado, no poseen la capacidad de generar nuevas resistencias como respuestas a la presión del medio. En cambio, los insectos que tienen una generación por año, e incluso varias en un mismo año, pueden en corto tiempo vencer las barreras presentes en el hospedante.

La asociación de las plantas de ciclo de vida largo, con hongos endofitos con capacidad de adaptación

similar a los insectos y patógenos, representaría una respuesta de la planta a los cambios producidos por las plagas de ciclo de vida corto.

Según esta hipótesis las plantas perennes deberían estar estrechamente asociadas con endofitos fúngicos con características mutualistas activas contra patógenos e insectos, mientras que las plantas anuales no presentarían esta asociación, o esta sería de características diferentes, ya que la presencia de los endofitos no sería necesaria ni ventajosa. En estas plantas la recombinación durante la floración, proveería de la oportunidad para generar nuevas defensas.

Para comprobar esta hipótesis estudiamos el sistema Juncus sp-endofitos, a fin de determinar la flora endofítica, sus frecuencias de aparición y los patrones de colonización de estos organismos.

Materiales_y_métodos

Para este estudio se seleccionaron dos especies perennes de Juncus : Juncus_imbricatus_var.chamissonis y Juncus_microcephalus, y una especie anual: Juncus_bufonius_var.bufonius.

Los muestreos de la primera especie se realizaron en agosto de 1986 y abril de 1988, en los alrededores de la

Ciudad Universitaria. La segunda especie fue coleccionada en noviembre de 1988 en los alrededores de Derqui (Bs.As), y la tercera en febrero de 1987, de la costa del río en los alrededores de Martínez.

Aislamiento

Se utilizó un promedio de nueve plantas para cada especie, las que fueron lavadas en agua corriente previo a la esterilización superficial. Tanto de tallos como de las hojas de cada planta, se extrajeron al azar 8 submuestras que luego fueron esterilizadas según las técnicas habituales, con un primer lavado en alcohol 50% durante 1 min., una esterilización con hipoclorito de sodio (80g/dm³)-agua, 2:1 durante 3 min., y un enjuague final en alcohol 50% durante 1 min.

Las submuestras fueron sembradas en cajas de Petri con agar agua al 2%, e incubadas a temperatura ambiente y luz diurna. Al cabo de 15-20 días se procedió al aislamiento e identificación de las cepas.

Observación directa de los endofitos

Para conocer la ubicación de los endofitos y sus patrones de colonización, realizamos cortes longitudinales, a mano alzada, de tallo y hoja. Estos cortes, que abarcaron la epidermis y el parénquima subyacente, fueron clarificados mediante ebullición en lactofenol-etanol (1:2 v/v) durante

10-15 min. y reposo posterior durante 12 hs a temperatura ambiente.

Luego fueron teñidos con alguno de los siguientes colorantes: trypan blue 0.05% (Phillips y Hayman, 1970), fucsina ácida-verde de malaquita (Alexander, 1980) o chlorazol black E (Brundrett et al, 1984)

La correspondencia entre los patrones de colonización y el endofito que los produce, no siempre resultó evidente. En esos casos se acudió a cultivos de trocitos de tallo y hojas en cámaras húmedas, y posterior observación microscópica de los mismos.

Análisis estadístico

La frecuencia de infección total, tanto para tallo, hoja o planta entera, se calculó teniendo en cuenta el número de trozos infectados por el número de trozos incubados, y la frecuencia de infección por especie, como el número de trozos infectados por un hongo dado por el número de segmentos incubados.

Se utilizó una prueba de diferencias de proporciones (Dixon y Massey, 1965), con el fin de establecer si existían diferencias entre los porcentajes de infección de hoja y tallo, en cada uno de los juncos analizados, y la prueba de Page de las alternativas ordenadas (Daniel, 1978), para comprobar el ordenamiento de

las frecuencias de infección de las especies endofíticas en los hospedantes perennes.

Resultados

Aislamiento

En la tabla 8 pueden observarse las especies endofilas halladas en los hospedantes anual y perennes, y su frecuencia de infección tanto en hoja como en tallo. En todos los casos la frecuencia de infección de la hoja fue mayor que la del tallo: J.bufonius 20,8%(H) y 10%(T); J.imbricatus var. chamissonis 76,6%(H) y 59,1%(T) y J.microcephalus 37,3%(H) y 19,5%(T).

El test de diferencia de proporciones muestra que estas diferencias son significativas:

$$0,233 < p_1 - p_2 < 1,596$$

$$0,07 < p_1 - p_2 < 0,27 \quad p < 0,05$$

$$0,135 < p_1 - p_2 < 0,345, \text{ respectivamente}$$

El número de especies endofitas presentes en el junco anual es notoriamente mayor que en los dos juncos perennes, y sus frecuencias de infección son en todos los casos inferiores al 3,3%.

En los dos juncos perennes, por el contrario, hay pocos endofitos, 1-2 con alta frecuencia y los restantes con frecuencias menores al 3,1 %.

Tabla 8 Frecuencias de los endofitos aislados de hoja (H) y tallo (T) ;

	<u>J.imbricatus</u> var. <u>chamissonis</u>		<u>J.microcephalus</u>		<u>J.bufo</u>	
	H	T	H	T	H	T
1- <u>Pleospora</u> aff. <u>towogotiensis</u>	42.5	31.8	36.8	(1)	(1)	(1)
2- <u>Alternaria</u> <u>alternata</u>	10	13.7	13.1	22.5	2.5	12.5
3- <u>Caniochaeta</u> sp.	6.2	0	3.1			
4- <u>Phomopsis</u> sp. I	3.7	2.5	3.1			
5- <u>Stagonospora</u> sp.	6.2	0	3.1			
6- <u>Phoma</u> sp. I	0	6.2	3.1			
7- <u>Gnomoniella</u> sp.	0	1.2	0.6			
8- <u>Caniothyrium</u> sp.	1.2	0	0.6			
9-aff. <u>Phoma</u> <u>tospora</u>	5	1.2	3.1			
10- <u>Arthrinium</u> sp. I	1.2	0	0.6			
11- <u>Cladosporium</u> <u>cladosporioides</u>				0	3.7	1.8
12-aff. <u>Chaetophoma</u> sp.				0	3.7	1.8
13- <u>Monodyctis</u> sp.				0	1.2	0.6
14- <u>Phoma</u> sp.				1.2	0	0.6
15- <u>Epicoccum</u> sp.				2.5	0	1.2
16- <u>Phomopsis</u> sp.				1.2	0	0.6

Tabla 8 (cont.)

17-aff- <u>Cytospora chrysosperma</u>	2.0	1.2	3.3
18- <u>Penicillium lilacinum</u>	0.8	1.6	2.4
19- <u>Phaeoisaria clematidis</u>	1.6	0.4	2
20- <u>Megaloseptoria mirabilis</u>	1.6	0	1.6
21- <u>Acremonium</u> sp.	0	1.2	1.2
22- <u>Colletotrichum linderuthianum</u>	1.2	0	1.2
23- <u>Macrophoma smilacina</u>	0.4	0.8	1.2
24- <u>Stagonospora caricinella</u>	1.2	0	1.2
25- <u>Phoma</u> sp. .)	0.8	0.4	1.2
26- <u>Arthrinium</u> sp.	0.8	0	0.8
27- <u>Clypeopycnis aeruginascens</u>	0.8	0	0.8
28- <u>Colletotrichum</u> sp.	0	0.8	0.8
29- <u>Cytospora</u> sp.	0.8	0	0.8
30- <u>Fusarium</u> sp.	0.8	0	0.8
31- <u>Phomopsis</u> sp.11	0.4	0.4	0.8
32- <u>Scytalidium</u> sp.	0.4	0.4	0.8
33- <u>Drechslera sorokiniana</u>	0.4	0	0.4

Tabla 8 (cont.)

<u>34-Haplographium catenatum</u>				0	0.4	0.4	0.4
<u>35-Microdiscula rubicola</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>36-Phoma sp.II</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>37-Phoma sp.IV</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>38-Phoma sp.V</u>				0	0.4	0.4	0.4
<u>39-Phoma sp.VI</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>40-Phoma sp.VII</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>41-Rhinocladella sp.</u>				0	0.4	0.4	0.4
<u>42-Stagonospora vitensis</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>43-Stemphyllum sp.</u>				0	0.4	0.4	0.4
<u>44-Tetraccladium setigenum</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>45-Tetraploa elisii</u>				0.4	0	0.4	0.4
<u>46-aff. Tubeufia amazonensi</u>				0.4	0	0.4	0.4
47-Micelio dematiaceo I	5	1.2	1.2				
48-Micelio dematiaceo II	1.2	1.2	3.1				
49-Micelio dematiaceo III	3.7	0	1.8				
50-Micelio estéri	0.6	2.5	3.1	0.8	1.2	2.1	
Frecuencias	76.6	59.1	70.3	37.3	13.5	25.8	31

La prueba de Page de las alternativas ordenadas, muestra que existe en ambos juncos perennes, un ordenamiento significativo de las especies endofilas, siendo las más frecuentes P.towgottiensis (36,8%) y A.alternata (13,1%) para Juncus___imbricatus___var.chamissonis (valor del estadístico de prueba:-3,66), y A.alternata (12,5%) en J.microcephalus (valor del estadístico de prueba :-2,24).

El hecho de que algunas especies se presenten con altas frecuencias de infección, nos estaría indicando una mayor afinidad de las mismas hacia el hospedante.

En el trabajo de Cabral y Carroll (en prensa) surgieron resultados similares. Las tres especies de juncos perennes:J. effusus var. pacificus, J. patiens y J. bolanderi poseen endofitos con frecuencias entre 70-100%, mientras que los endofitos de la especie anual (J. bufonius), presentan frecuencias inferiores al 5%. Estas últimas especies son en general diferentes a las halladas por nosotros en el junco anual.

La existencia de diferentes especies fúngicas sobre el mismo hospedante (J. bufonius), junto con la baja frecuencia con que se presentan, son indicios del carácter transitorio u oportunista de estas especies.

Patrones de colonización

Las observaciones citológicas se realizaron en los hospedantes perennes, teniendo en cuenta que los más altos

porcentajes de infección por especie endofítica se hallan en esos hospedantes, y en consecuencia es mayor la probabilidad de reconocer e identificar los patrones de colonización.

J.imbricatus var.chamissonis

Se hallaron básicamente tres patrones de colonización.

1) tipo A (lam.VI,1-5): el endofito ocupa la cámara subestomática y de allí crece intercelularmente entre las células del mesófilo. Es el patrón que se presenta con mayor frecuencia (70% de las observaciones).

La colonización se inicia a partir de la germinación de una espora (lam.VI,1). De la/las células de la espora se origina un tubo germinativo que se introduce a través del ostiolo del estoma hasta la cámara subestomática (lam.VI,2). Una vez alcanzada la cámara subestomática, desarrolla 3-6 células globosas que ocupan todo el espacio de la cámara (lam.VI,3). De estas células, las más distales se adelgazan y crecen intercelularmente en el parénquima (lam.VI,4 y 5).

2) Tipo B (lám.VI,6-8): el endofito se restringe a unas pocas células fúngicas en el interior de una célula fundamental (frecuencia del 10%).

La infección se manifiesta por la presencia de una primer célula fúngica, globosa o vesicular, en el interior

de la célula hospedante, conectada con un canal y orificio de penetración en la pared externa de la célula infectada (lam.VI,6).

A partir de esta célula vesicular, se desarrolla en una o dos direcciones, una hifa corta de 3-5 células rectangulares (lam.VI,6,7 y8).

Hay otras células del hospedante que aparecen necrosadas, con indicios de infecciones incipientes, pero sin desarrollo de endofito en su interior. En estos casos se observa el orificio de penetración y una zona circular densa alrededor de él. Esta zona se denomina papila y según Aist (1976) es una deposición de pared nueva alrededor del sitio de la infección.

3) tipo C: el endofito se ubica en, pero sin llenar, la cámara subestomática. Las células son cilíndricas, delgadas, y las hifas son poco extensas. Morfológicamente, es diferente del endofito del patrón A, y se presenta con menor frecuencia (lam.VI,9).

Si relacionamos estos patrones de colonización con los endofitos aislados, podemos encontrar una probable correspondencia entre Fleospora aff. towagotiensis y el patrón A de colonización. Esta correspondencia está basada primeramente, en la observación de esporas de este hongo con su tubo germinativo penetrando el ostiolo del estoma y en segundo lugar, en que tanto el patrón A como

P.towagotiensis son los que aparecen con mayor frecuencia.

De igual forma se puede relacionar el patrón B de colonización con la especie Stagonospora sp. A pesar de que este patrón es el segundo en frecuencia de los hallados sobre este hospedante, y Stagonospora sp., aparece en los aislamientos con baja frecuencia (3,1%), la asociación pudo establecerse basándonos en que Stagonospora innumerosa (en J.efusus var.pacificus, Cabral y Stone, op.cit.), presenta un patrón similar de colonización.

No es posible establecer una relación entre el patrón C de colonización con alguno de los endofitos aislados, pero dada la similitud en las características morfológicas con el patrón de infección de A.alternata observado por O'Donnell y Dickinson (1980), es probable que se trate de este hongo.

Juncus microcephalus

En este hospedante encontramos también tres patrones de colonización

1) Tipo D (lam.VII,1-7). El endofito se encuentra dentro de una célula epidérmica fundamental.

La infección se inicia a partir de un tubo germinativo (no observamos esporas) que desarrolla en su extremo un apresorio (lam.VII,1). A partir de este apresorio se produce una hifa de infección que da origen a un orificio y a un canal de penetración. Este último atraviesa la pared epidérmica superior (lam.VII,2 y 3).

Muchas veces la colonización no progresa y las células poseen sólo canal de penetración y papila, sin desarrollo fúngico dentro de la célula hospedante.

Si la infección progresa, se forma una célula vesicular, que dará origen a una hifa endofítica (lam.VII,2). Paralelamente a este desarrollo, el citoplasma de la célula hospedante se colapsa progresivamente.

La hifa endofítica es delgada, tabicada, poco ramificada y con células cilíndricas (lam.VII,4 y 5). Se extiende a lo largo de la célula hospedante, ocupando 2/3 partes o el total de esta célula. La infección puede continuar hacia una célula adyacente (fundamental u oclusiva). En estos casos el extremo de la hifa inicial se ensancha, dando una terminación globosa o plana sobre la pared de la célula: célula madre haustorial? (CMH, lam.VII,6,7 y 8), y de allí emite un cuello haustorial? (CH) que atraviesa la pared de separación e infecta a la célula

vecina, mediante un haustorio? (H). Este tipo de infección lateral no progresa más allá de dos células y es de baja frecuencia.

2)Tipo E (lam.VII,8-12). El endofito se ubica en la cámara subestomática .

Se origina de una espora bicelular que desarrolla, a partir de una de sus células, un tubo germinativo. Este se acerca al estoma y forma sobre la abertura del mismo, un apresorio (lam.VII,8 y 9). A partir de este apresorio se genera una hifa que penetra el ostiolo hacia la cámara subestomática. Desde allí surgen ramificaciones hifales en una o varias direcciones, que se desarrollan intercelularmente en el mesófilo (lam.VII,11 y 12).

3)Tipo F (lam.VII,13). El endofito se halla dentro de las células subsidiarias del estoma. Es el menos frecuente. La mayoría de las células aparece con su citoplasma colapsado, levemente necrosadas. En muy pocas pudimos observar la hifa dentro de la célula. Esta consta de 2-3 células hifales, no es ramificada, y se ubica según el eje mayor de la célula hospedante.

No podemos asegurar que no sea una derivación del patrón D, ya que si consideramos la lam.VII,5 donde se establece una conexión entre la célula fundamental y la oclusiva, el patrón F podría ser en realidad resultado de una conexión con células subsidiarias. Stone (1987), observó

que en el estadio de necrosis de la hoja, la infección de las células epidérmicas por R.parkeri se expande a las células oclusivas o subsidiarias.

En este junco perenne, el endofito aislado con más frecuencia fue A.alternata (12,5%) y los restantes resultaron con frecuencias menores a 3,1%. Los porcentajes de los patrones de colonización fueron 70% para el tipo D, 30% para el E y 5% para el F.

En este hospedante, no pudo encontrarse la correspondencia entre aislamientos y los tipos de colonización. Ni por observación directa ni basándonos en los cultivos en cámaras húmedas.

Discusión

De acuerdo a los resultados hallados para los dos juncos perennes, podemos caracterizar a los patrones de colonización :

Patrón de colonización intercelular.

La infección interesa al estoma, con crecimiento en las cámaras subestomáticas. Por ej.: E.towogotiensis y endofito del patrón C (A.alternata?), en J.imbricatus var.chamissonis; y endofito E en J.microcephalus.

Las coloraciones que dieron mejor resultado para este patrón intercelular fueron trypan blue y chlorazol black E, con el endofito teñido de azul o negro respectivamente.

Patrón de colonización intracelular

Interesa a una célula epidérmica:

a) fundamental: representado por los endofitos Stagonospora en J.imbricatus var.chamissonis, y endofito del tipo D en J.microcephalus.

b) células subsidiarias : representado por el tipo F en J.microcephalus.

La coloración para este patrón fue fucsina ácida-verde de malaquita. El endofito aparece de color verde claro.

Según Carroll (1986) los endofitos se comportan como simbioses mutualistas si reúnen determinadas características (ver pag 11).

En el caso de J.imbricatus var.chamissonis, E.towogotiensis parece reunir estos requisitos dado que:

1) su desarrollo es intercelular, no habiéndose observado células necróticas o dañadas, ni penetración en las células del parénquima; 2) su trasmisión es de tipo lateral, es decir a través de esporas que se propagan por el viento o el agua; 3) aparece con alta frecuencia con respecto a los demás endofitos y 4) produce infecciones localizadas, en gran cantidad y distribuidas uniformemente por toda la planta. También el endofito del tipo E en

J.microcephalus se comporta en forma similar pero con frecuencia menor.

Por otra parte, A.alternata (patrón C?) que se presenta con alta frecuencia en J. imbricatus var. chamissonis y en J.microcephalus, es considerada por O'Donnell y Dickinson (1980), como hongo epifito. Nuestras experiencias en el estudio de los endofitos en otros vegetales, nos sugiere que esta especie podría comportarse como endofito, ubicándose en las cámaras subestomáticas, emitiendo desde allí hifas hacia los espacios intercelulares del parénquima, y estableciendo una íntima relación con el hospedante.

En los patrones de colonización intracelulares (endofitos como Stagonospora o endofito del tipo D) la presencia de papilas indicaría una reacción del hospedante a la presencia del endofito, probablemente para evitar el progreso de la hifa infectante (Smith, 1900). La presencia de apresorios, células madres haustoriales? y haustorios? sugiere una relación de estos hongos con formas patogénicas.

Sin embargo, la presencia de estos endofitos no provoca daños en hospedante, su transmisión es lateral y la infección está uniformemente distribuida, aunque con baja frecuencia; su patrón de infección es semejante al de R.parkeri, endofito del abeto Douglas (Stone, 1987). De acuerdo a estas características, estos endofitos reunirían los requisitos de los simbiosistas mutualistas.

En estos casos podemos considerar que existen rasgos patogénicos, pero restringidos a una única célula hospedante, con formación de CMH, CH y con necrosis de la célula infectada. Estos aspectos de la estrategia endofítica mostrarían la conexión de estos hongos con sus antecesores patogénicos.

Los resultados obtenidos indican que los hospedantes perennes están estrechamente asociados con endofitos, cuyas características de colonización, frecuencias, distribución de la infección y formas de dispersión, sugieren un comportamiento como simbioses mutualistas.

Por el contrario, en el junco anual el gran número de especies endofíticas, su diversidad y sus bajas frecuencias, sugieren que se trata de organismos transitorios u oportunistas.

La comprobación de la relación entre los hospedantes perennes y sus endofitos, hace probable la hipótesis planteada, es decir, que el hospedante perenne participaría de esta asociación con el fin de aumentar su capacidad de respuesta frente a los cambios del ambiente.

Cuáles podrían ser estos beneficios?: contribución al mejor crecimiento y desarrollo de la planta? antagonismo hacia patógenos? resistencia al ataque de los herbívoros?

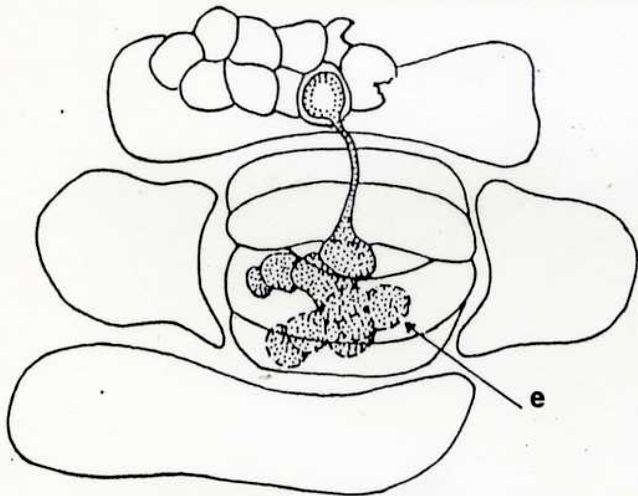
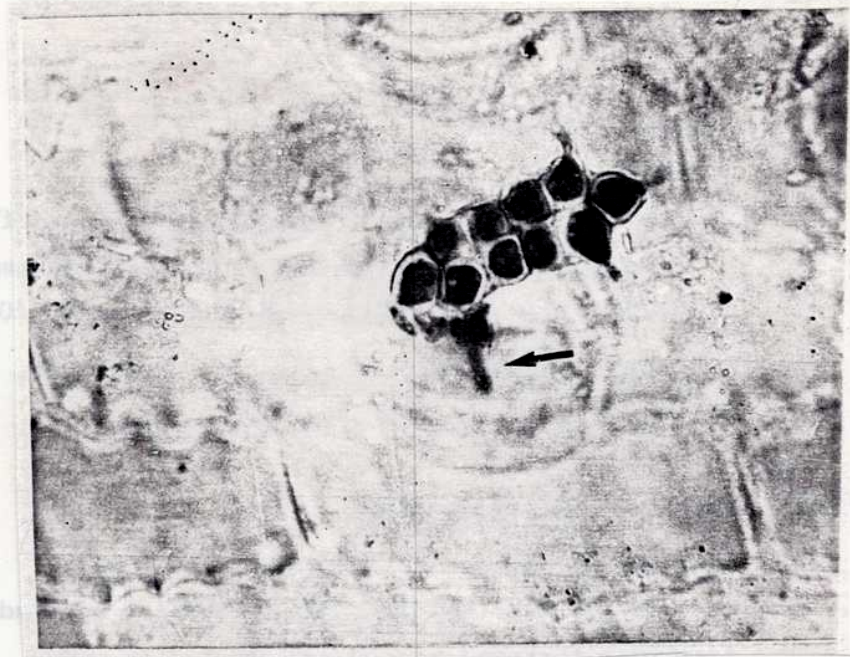
Dilucidar estas preguntas requiere un estudio posterior de las interacciones hospedante-endofito-herbívoro.

Lámina VI

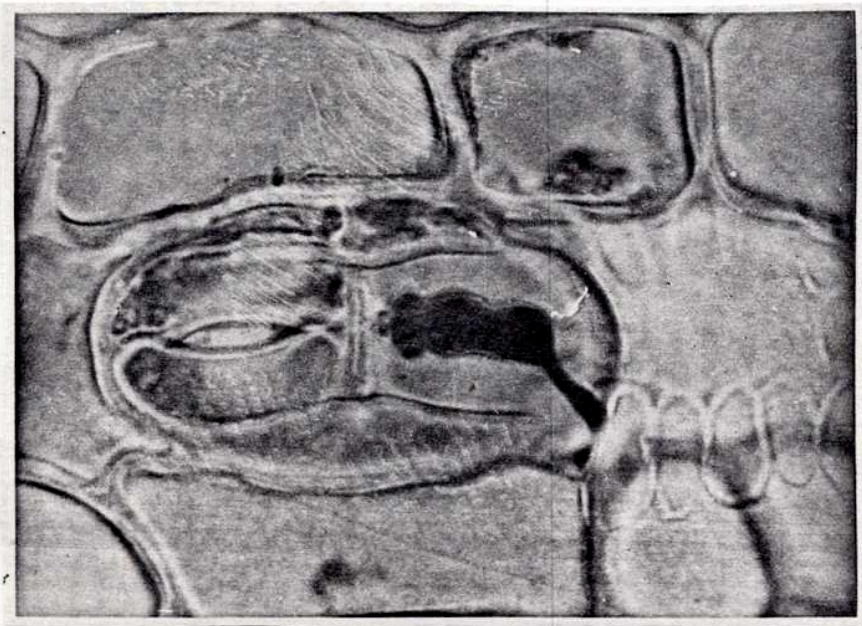
Patrón A

- 1 Infección de un estoma por una espora
t:tubo germinativo (1000x)
- 2.Células del endofito dentro de la cámara subestomática (e)
- 3.Endofito alojado en la cámara subestomática (1000x)

1



2



3

Lamina VI (cont.)

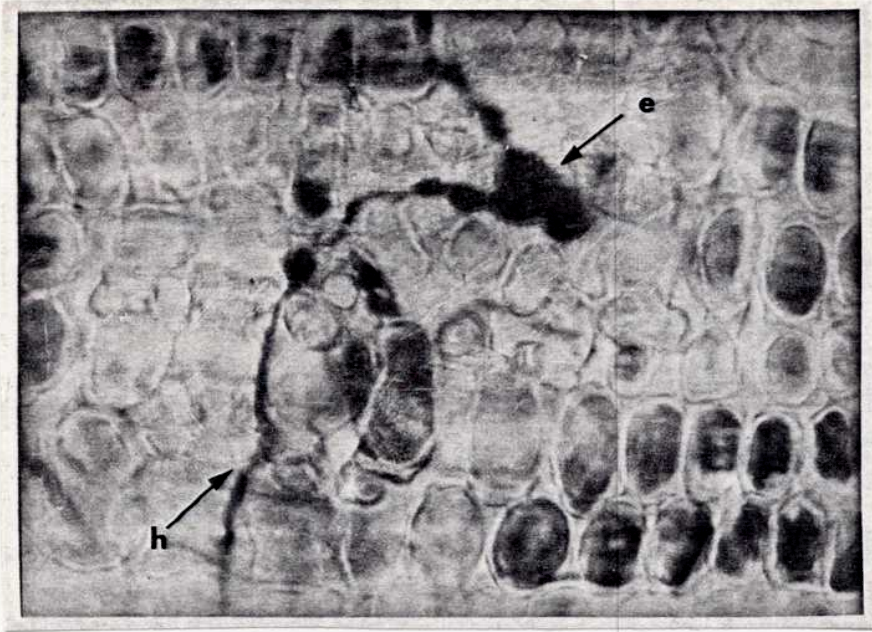
Patron A

4.Desarrollo hifal entre las células del mesófilo
e.células del endofito en la cámara subestomática
h.hifas entre las células del parénquima (1000x)

5.Cámara subestomática con micelio endofítico
h.hifAs entre las células del mesófilo

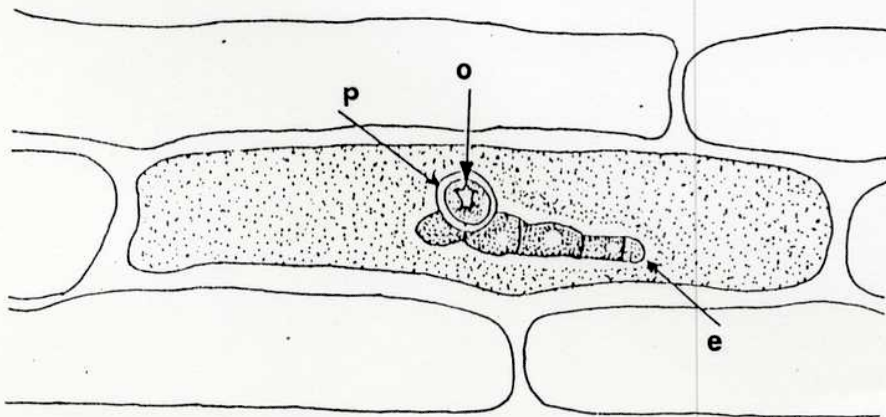
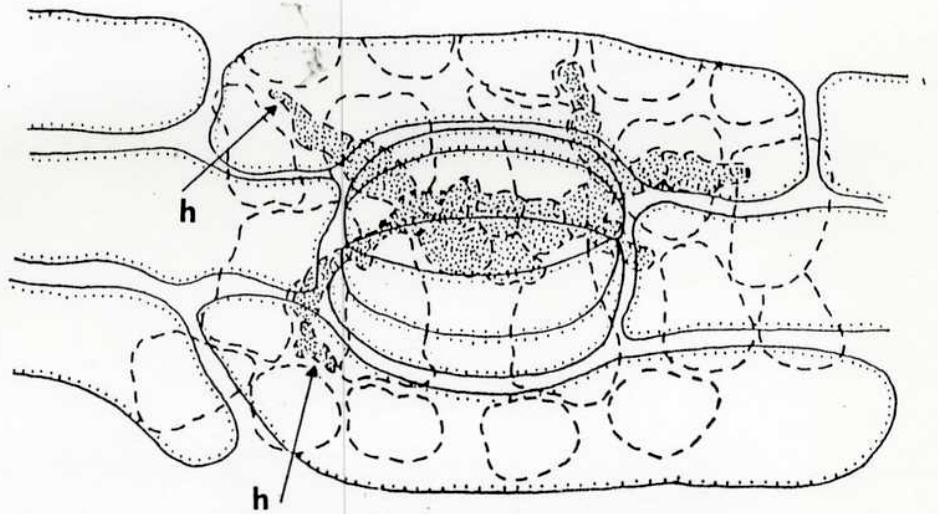
Patron B de colonización

6.Endofito dentro de una célula epidérmica
o.orificio de penetración de forma estrellada
e.hifa endofítica
p.papila



4

5



6

Lámina VI (cont.)

Patron B

7. célula infectada con el endofito (1000x)

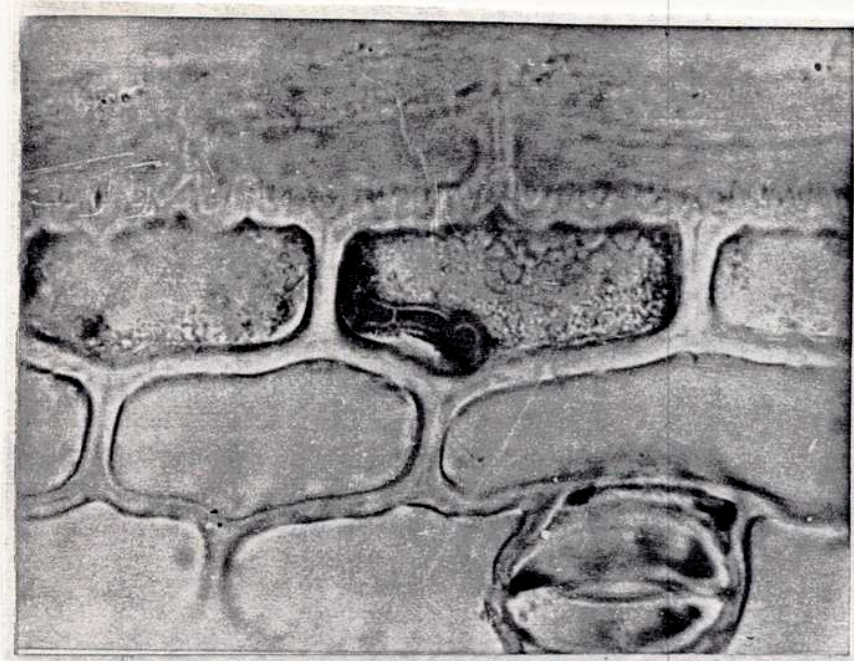
8. Dibujo del estadio anterior

v. vesícula

e. hifa endofítica

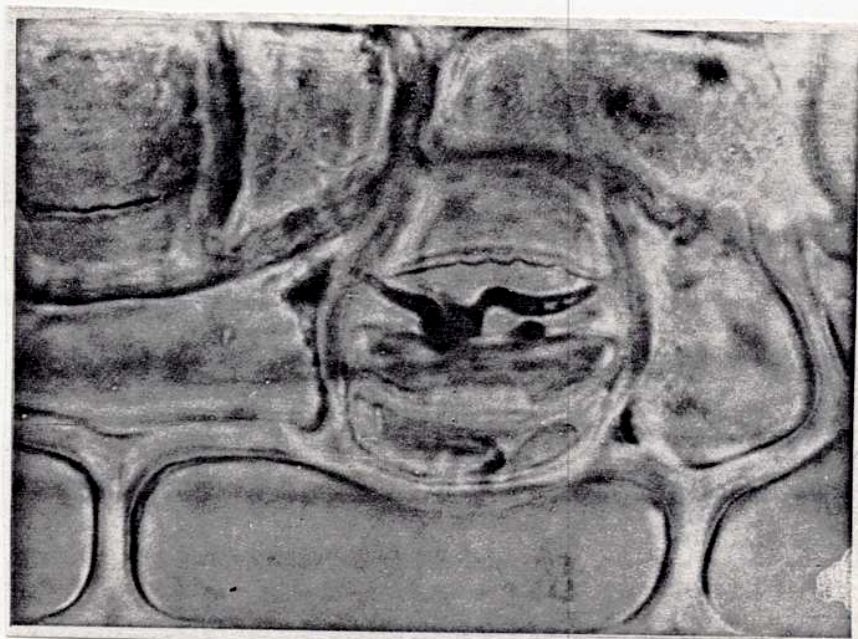
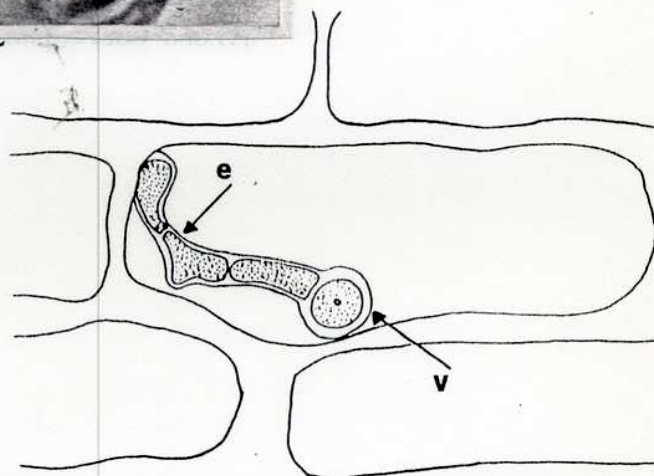
Patrón C

9. Hifas en el interior de la cámara subestomática



7

8



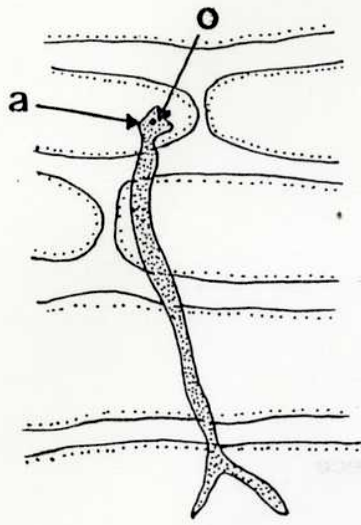
9

Lámina VII

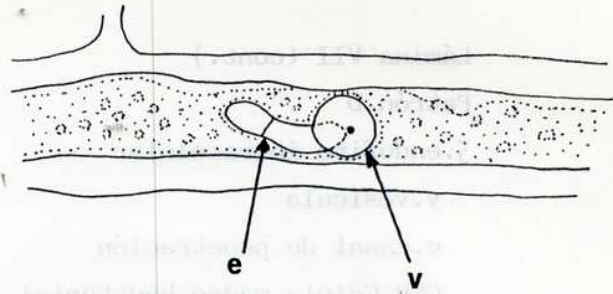
Patrón D de colonización

1. Tubo germinativo con apresorio
 - a. apresorio
 - o. orificio de penetración
2. Endofito en el interior de una célula epidérmica
 - v. vesícula
 - e. hifa endofítica en desarrollo
3. Endofito ocupando la célula epidérmica
 - c. canal de penetración
 - v. vesícula
4. Foto correspondiente al estadio anterior (600x)

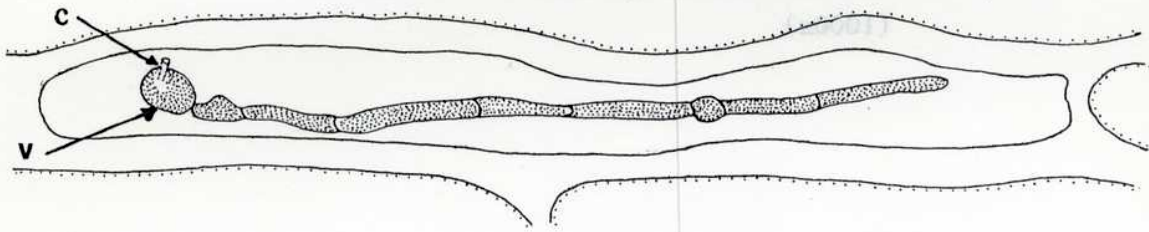
Lámina VII



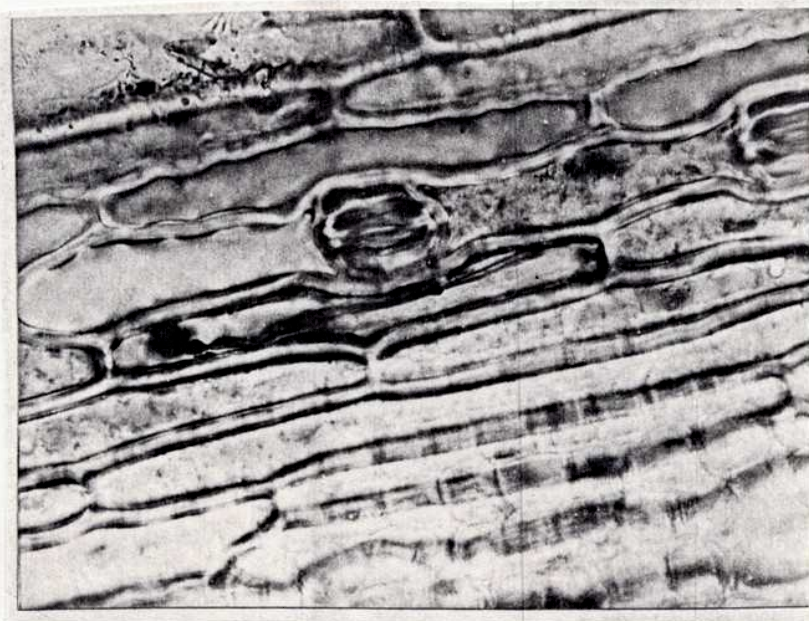
1



2



3



4

Lámina VII (cont.)

Patrón D

5. endofito intracelular

v. vesícula

c. canal de penetración

CMH. Célula madre haustorial

CH. cuello haustorial

6. Detalle de CMH y CH (1000x)

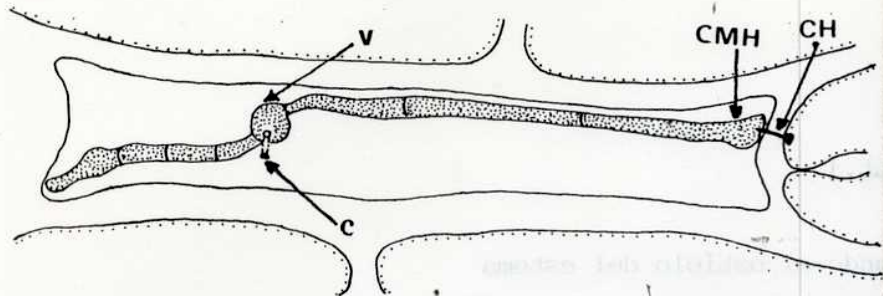
7. Otro ejemplo donde la conexión se establece
con una célula fundamental

Patrón E

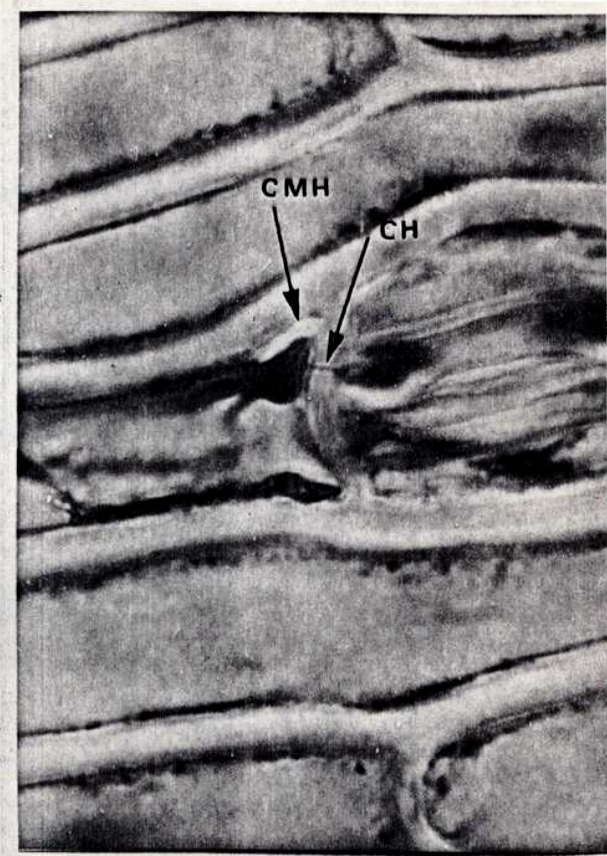
8-9. Espora bicelular en germinación

a. apresorio sobre el ostiolo del estoma
(1000x)

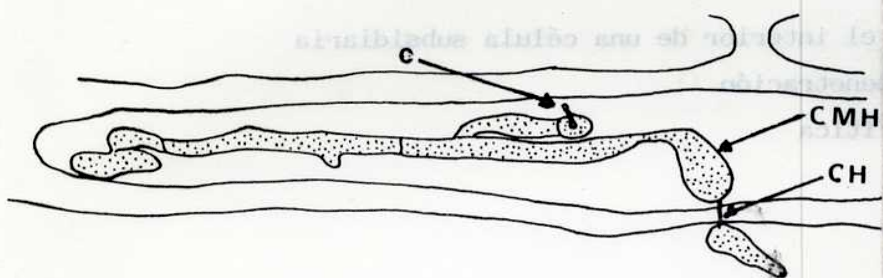
Lámina VII (cont.)



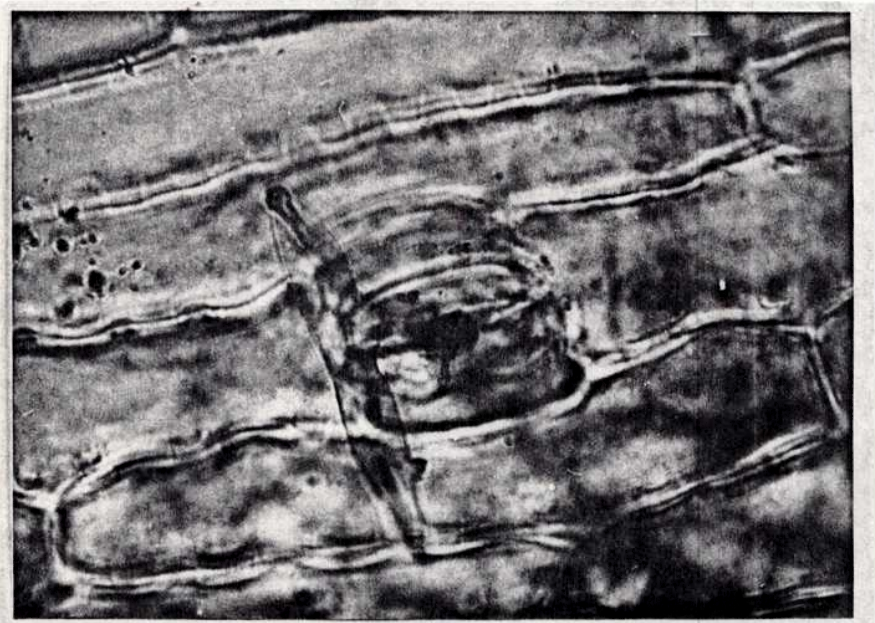
5



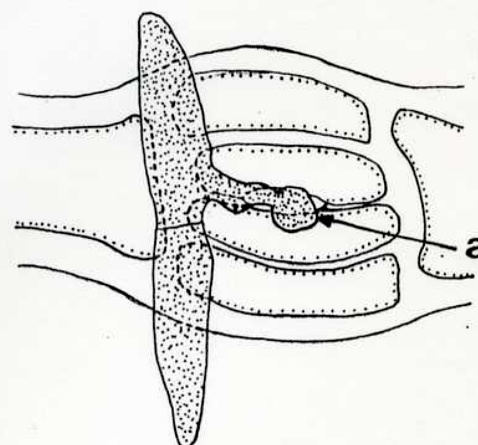
6



7



8



9

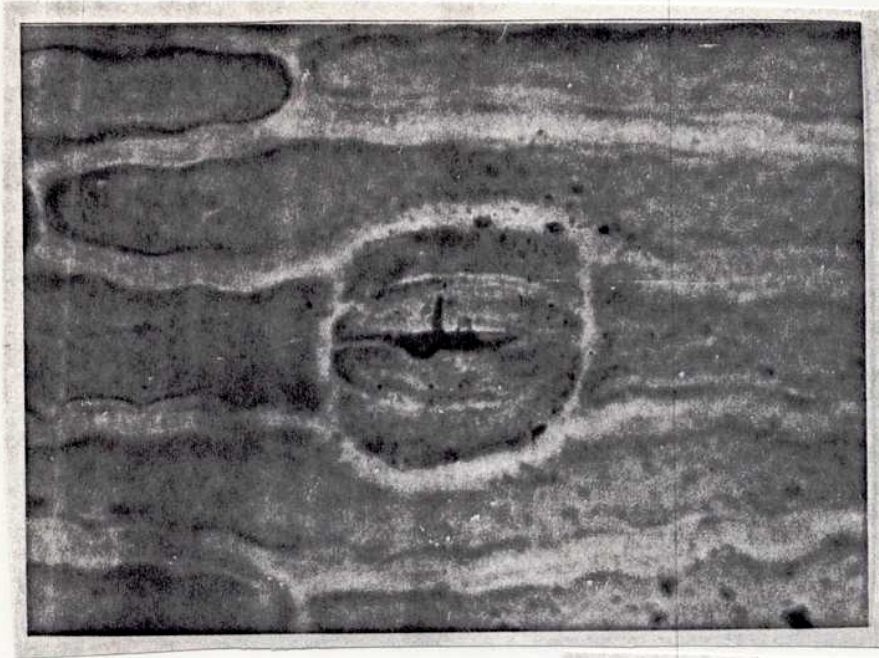
Lámina VII (cont.)

Patrón E

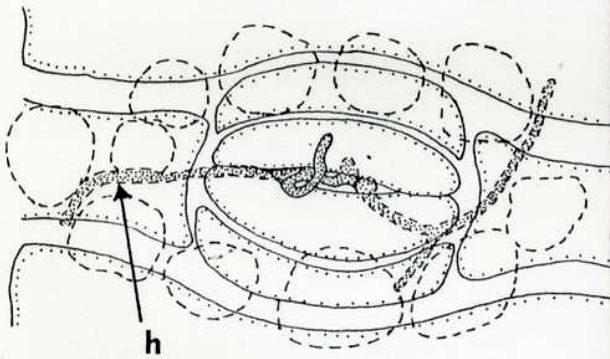
10. Hifa penetrando el ostíolo del estoma
11. Crecimiento de las hifas entre las células mesófilo
12. Dibujo de los estadios 10 y 11.

Patrón F.

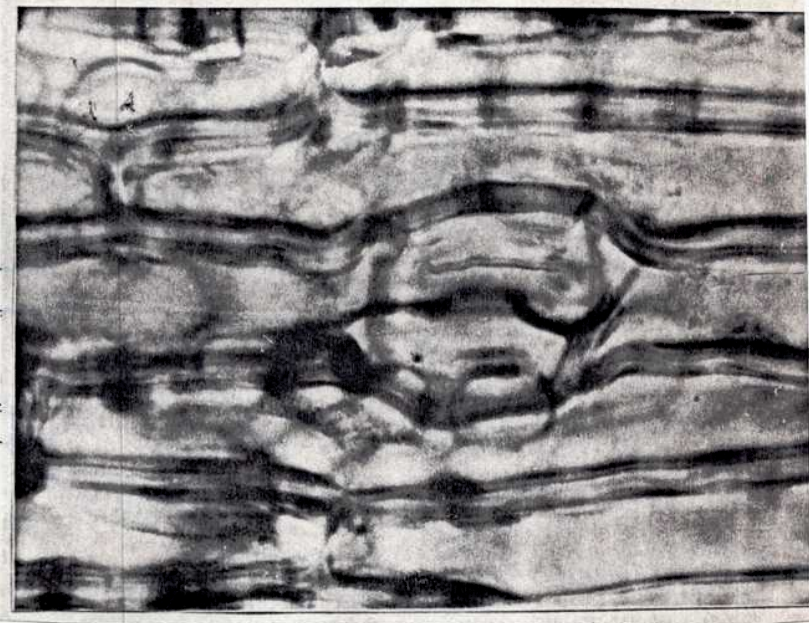
13. Endofito en el interior de una célula subsidiaria
 - c. canal de penetración
 - e. hifa endofítica



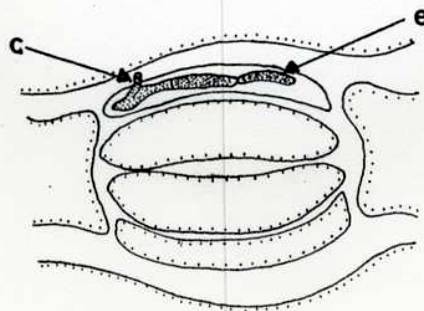
10



12



11



13

CAPITULO III

ENDOFITOS EN LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS
PATOGENOS FUNGICOS

(en Eucalyptus_viminalis)

Puede decirse que dos organismos interactúan cuando la presencia de uno afecta de alguna manera la performance del otro. Estas interacciones son comunes entre los hongos a causa de su típico cuerpo vegetativo y de la versatilidad que poseen para crecer y reproducirse (Rayner y Webber, 1984).

Las interacciones inter e intraespecíficas que ocurren entre los micelios que colonizan un sustrato determinado (ramas, madera) permite identificar individuos dentro de las poblaciones y conocer la estructura de la comunidad fúngica (Boddy y Rayner, 1982; Boddy et al. 1985; Rayner y Todd, 1979).

También estas interacciones proporcionan información sobre las características fúngicas que permiten utilizar a las especies como control de plagas en condiciones naturales (Skidmore y Dickinson, 1976).

Los ejemplos inequívocos de antagonismos entre endofitos y otros microorganismos son pocos. Uno de ellos lo constituyen las especies de Lophodermium sp.. L.seditiosum (patógeno) no fructifica en presencia de L.conigenum (endofito), por lo que aquél es controlado en su reproducción y diseminación por la presencia del segundo, que evita así la infección por el patógeno de los árboles jóvenes sanos (Carroll, 1988).

A.coenophialum, por otra parte, es antagonista de muchos patógenos de pastos (White y Cole, 1985). Filtrados de cultivos de este endofito inhiben "in vitro" el crecimiento de patógenos tales como Nigrospora sphaerica, Periconia sorghina y Rhizoctonia cerealis.

Siegel et al. (1985) encuentran casos de antibiosis en cultivos de los endofitos A.lolii, Acremonium sp., Phialophora sp. y E.typhina contra un grupo de patógenos vegetales y hongos saprofiticos. La actividad antifúngica en esos casos dependía del aislamiento.

En este trabajo se ensayará la interacción entre endofitos y hongos del filoplano de E.viminalis, como patógenos potenciales. A modo de comparación también se estudiarán las interacciones de los epífitos entre sí y de los endofitos entre sí (Faifer y Bertoni, 1988).

Las interacciones fueron estudiadas "in vitro", sobre medio de agar extracto de malta (ME) a temperatura ambiente (18-27 °C) y luz continua. Se estudiaron las siguientes posibilidades: a) endofitos vs. endofitos, b) endofitos vs. epifitos y c) epifitos vs. epifitos. Todas las especies analizadas fueron aisladas durante el trabajo de la filósfera de E.viminalis por Cabral (1982). De este mismo trabajo surge la clasificación de las especies utilizadas como epifitas o endofitas.

Las especies fueron: como epifitos, Alternaria alternata (Fr.) Keisser, Cladosporium cladosporioides (Frez) de Vries, Epicoccum purpurascens Ehbred. (como E.nigrum, Cabral, 1985) y Nigrospora oryzae (Berk.& Br.) Petch. Como endofitos: Coccomyces martiniae Hansf., Coniothyrium sp., Macrophoma smilacina (Berk.) Berlese & Vogl. y Zoellneria eucalypti (Berk.) Dennis.

Se utilizaron dos métodos para la interacción: a) interacción de colonias y b) test de celofán. Cuadrados de 9 mm² extraídos de una colonia en crecimiento activo, fueron utilizados como inóculos.

a) Interacción de colonias. El enfrentamiento entre los micelios se realizó en cajas de Petri de 9 cm de diám., donde los inóculos se sembraron a una distancia de 5 cm si el rango de crecimiento de los mismos era rápido, y a una distancia de 3 cm cuando eran de crecimiento lento. Si entre los dos existía diferencia en el tipo de crecimiento, primero se sembraba el de crecimiento más lento hasta que la colonia tuviese 2-3 cm, y luego el segundo, de crecimiento rápido (Boddy et al. 1985).

Para cada enfrentamiento se realizaron tres cajas, con una caja control para cada hongo, y las experiencias se repitieron tres veces.

La inhibición fue evaluada como el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

$$\text{ICR: } (r_1 - r_2) / r_2 \times 100$$

donde ICR: inhibición del crecimiento radial de la colonia

r₁: radio en mm de la colonia sobre el lado no enfrentado.

r₂: radio de la misma colonia sobre el lado enfrentado (Fokkema, 1973; Rai y Singh, 1980; Melgarejo et al., 1985).

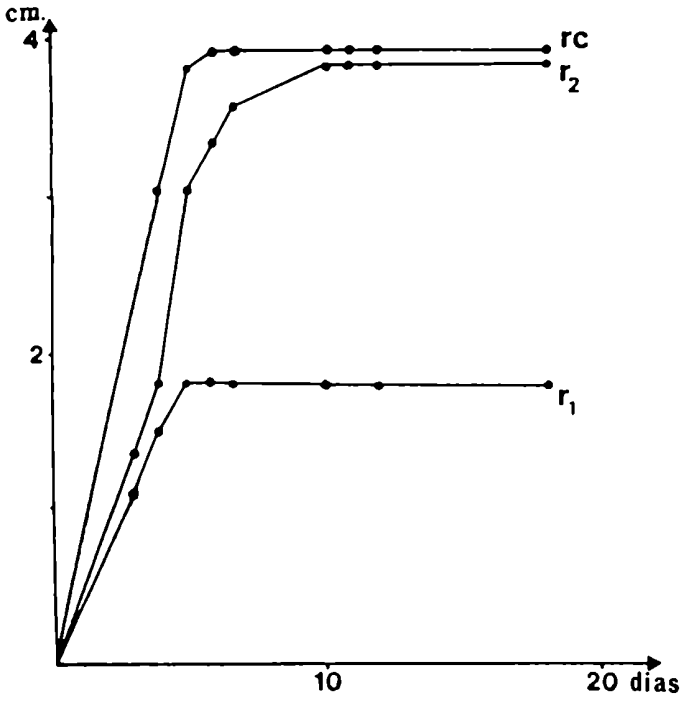
El crecimiento fue medido a lo largo de una línea imaginaria que une el centro de los dos inóculos (Morris y Dickinson, 1981), cada dos días, y en cada caso se construyó una curva del crecimiento radial en función del tiempo (Lam.VIII,1).

También se consideraron los cambios morfológicos de las colonias o tipos de reacción: colonia rodeando o superponiéndose a la otra; crecimiento entremezclado; cambios en la forma y color de las colonias; densidad del micelio aéreo y formación de pigmentos; ancho de la zona de

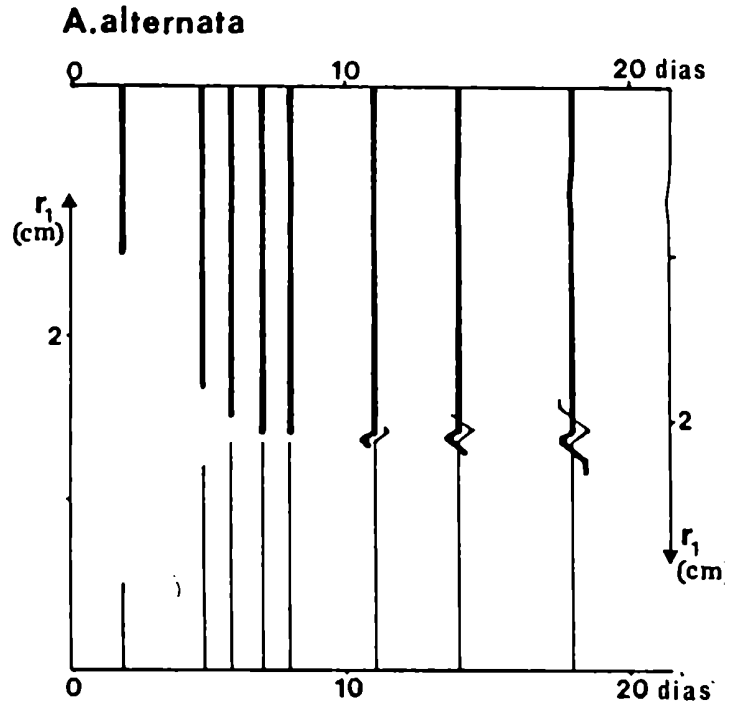
Lámina VIII

- 1.Crecimiento de M.smilacina según el método de interacción de colonias
- 2.Crecimiento de M.smilacina como hongo pasivo, según el test de celofán (E.purpurascens como hongo activo)
- 3-7.Diagramas de crecimiento de los hongos enfrentados (método de interacción de colonias)

Lámina VIII

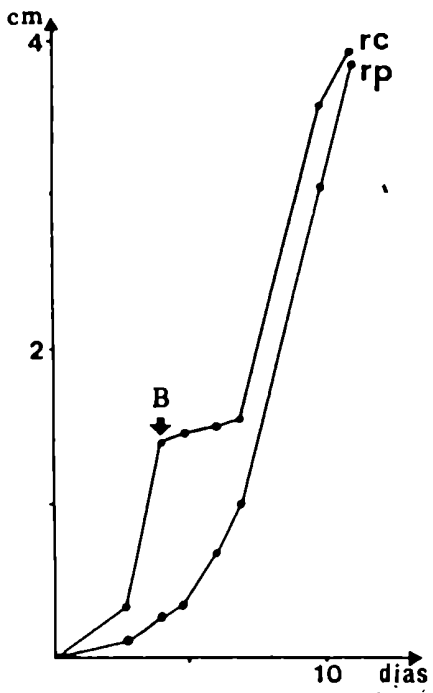


1

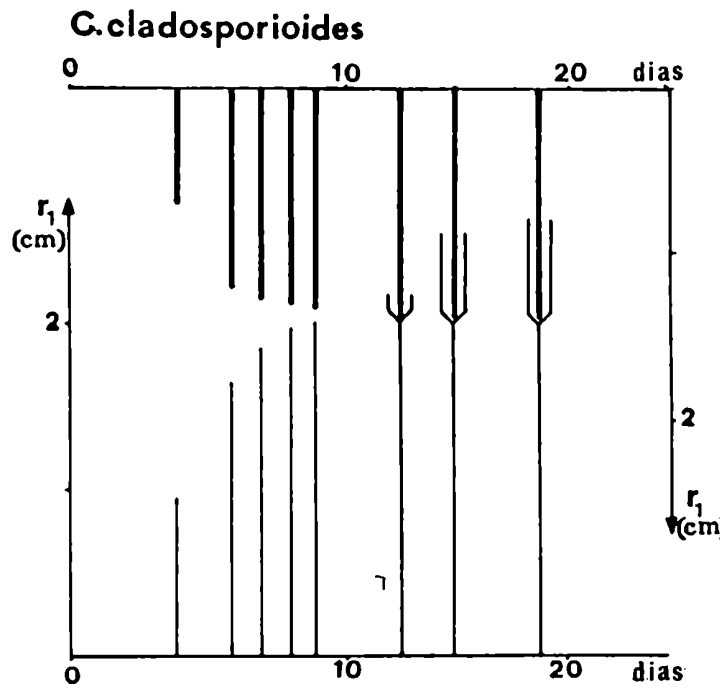


E.purpurascens

3



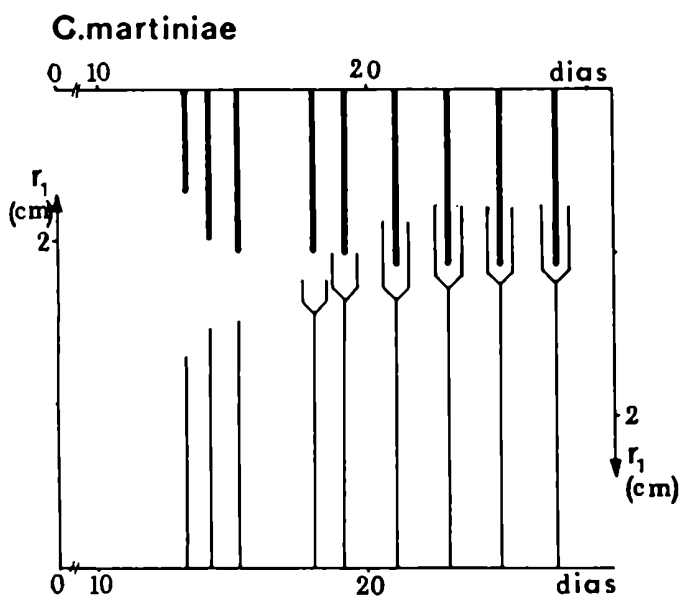
2



E.purpurascens

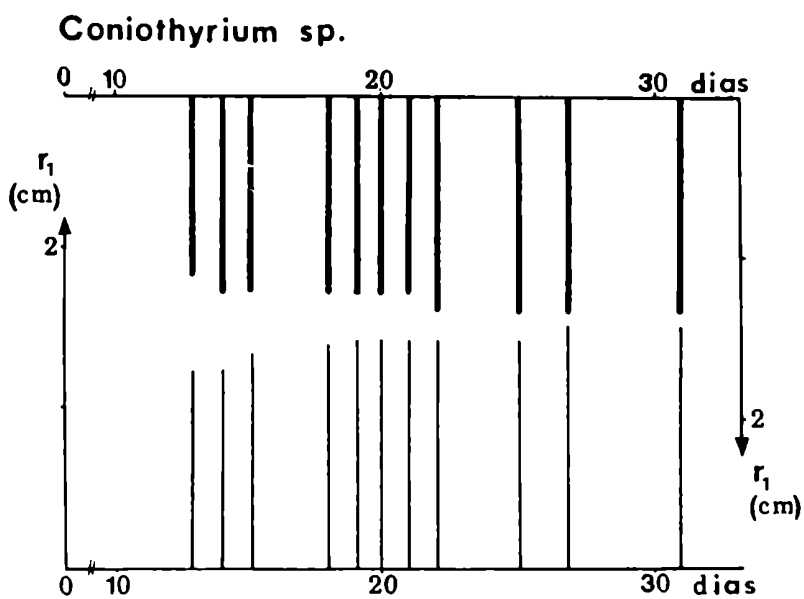
4

Lámina VIII (cont.)



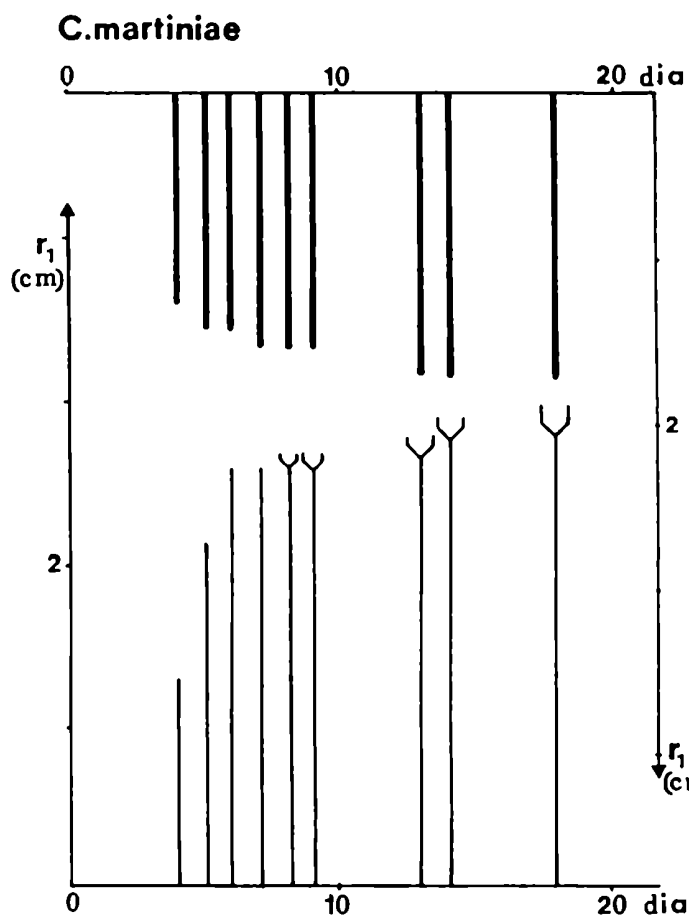
Z.eucalypti

5



Z.eucalypti

6



M.smilacina

7

inhibición (d) (Porter, 1924; Purkayastha y Bhattacharyya, 1982; Morris y Dickinson, 1981; Rayner y Todd, 1979; Skidmore y Dickinson, 1976).

b) Test de celofán. Los efectos de los metabolitos sobre el crecimiento fue estudiado según el método de Gibbs (Gibbs, 1967). Se inocularon centralmente cajas de Petri conteniendo celofán sobre medio de extracto de malta, con uno de los hongos a analizar, llamado "activo" (Skidmore y Dickinson, 1976). Una vez que la colonia ha alcanzado un diámetro de 3-4 cm, se marca el límite de crecimiento (zona A) y se retira el celofán con la colonia fúngica. Se siembra entonces, el segundo hongo denominado "pasivo", en el centro de la zona A.

Todos los hongos analizados fueron estudiados tanto en su condición de activos como de pasivos. A.alternata., C.cladosporioides y Coniothyrium sp. fueron incubados por periodos cortos, ya que sus hifas penetraban el celofán, interfiriendo en la experiencia (Skidmore Dickinson, 1976). Se hicieron cajas control para cada uno de las especies (Lám.IX,3-4)

Con el fin de comparar numéricamente la capacidad antagonista de las diferentes especies, se pensó en utilizar el porcentaje de inhibición sobre el celofán (ICRcf) utilizando la fórmula de Fokkema (1973) reemplazando r_1 por r_c (radio de la colonia control) y el radio r_2 por r_p (radio de la colonia pasiva):

$$ICRcf:rc-rp/ rc \times 100$$

Tambièn se calculò el valor de ICRcf en el punto B (Lám.VIII,2) cuando la inhibición del radio r_p era mayor allí.

Resultados

Se establecieron 5 tipos o grados de reacción, sobre la base de la morfología y crecimiento de los distintos pares de hongos. En cada caso se esquematizó el crecimiento del radio enfrentado y el ancho de la zona de inhibición (Lám.VIII,3 a 7, Morris y Dickinson, 1981). Los grados considerados fueron (tabla 9):

D1) crecimiento de las colonias hasta tomar contacto en una línea recta, y micelio entremezclado en la línea de interacción (Lam.VIII,3).

D2) crecimiento de una colonia rodeando a la otra, con contacto entre las hifas (Lam.VIII,4)

D3) crecimiento de una colonia rodeando a la otra sin contacto entre las hifas y $d < 2\text{mm}$ (Lam.VIII,5)

D4) inhibición mútua a una distancia $< 2\text{mm}$ con una línea recta de interacción entre las colonias (Lam.VIII,6)

Tabla 9 :Tipos de reacción para los distintos pares de hongos

D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
A.alternata vs. E.purpurascens	C.martiniae vs. E.purpurascens	E.purpurascens vs. N.oryzae	Z.eucalypti vs. Coniothyrium sp.	M.smilacina vs. C.martiniae
A.alternata vs. M.smilacina	M.smilacina vs. Coniothyrium sp.	A.alternata vs. C.martiniae		
M.smilacina vs. E.purpurascens	M.smilacina vs. C.cladosporioides	A.alternata vs. Coniothyrium sp.		
	A.alternata vs. C.cladosporioides	A.alternata vs. Z.eucalypti		
	N.oryzae vs. C.cladosporioides	C.martiniae vs. Z.eucalypti		
	E.purpurascens vs. C.cladosporioides	Z.eucalypti vs. E.purpurascens		
	A.alternata vs. N.oryzae	C.martiniae vs. Coniothyrium sp.		

D5) inhibición unilateral a una distancia > 2 mm (Lam.VIII,7).

Los hongos epifilos muestran reacción de tipo D1 a D3, mientras que los endofilos tienen tipos de reacción D3 a D5.

Por otra parte, en la tabla 10 se muestran los resultados de interacción para cada especie de acuerdo al método de interacción de colonias (ICR), al test de celofán (ICRcf), a la zona de inhibición (d) y al grado de reacción (D). Podemos observar 8 juegos de interacción, donde en cada uno se detalla la lista de hongos analizados y los valores correspondientes de ICR, ICRcf, d y D hallados para todos ellos en su confrontación con el primero.

Nosotros consideramos que existe antagonismo cuando se observan altos valores de aquellos índices. El hongo que produce la inhibición, es considerado antagonista y el que es inhibido, como sensible.

Por comparación de todos los resultados obtenidos podemos caracterizar el comportamiento antagonista o sensible de cada hongo.

A.alternata.

Tiene comportamiento antagonista contra E.purpurascens pero no contra otros hongos del filo plano.

Tabla 10 :Resultados de la interacción según el test de celofán (ICR_{cf}) e interacción de colonias (ICR, D, d)

	ICR (%)	ICR (%) cf	d (mm)	D
1) A.alternata				
E.purpurascens	62.5*	18 (27.2)	0	1
C.cladosporioides	30.2	10 (16.6)	0	2
N.oryzae	46.2	27.9	0	2
M.smilacina	30.6	14	0	1
Coniothyrium sp.	13	18.7	1	3
Z.eucalypti	32.1	6.6	1	3
C.martiniae	23.5	20.4	2	3
2) C.cladosporioides				
A.alternata	16.6	12.4	0	2
E.purpurascens	46.3	10.8	0	2
N.oryzae	35	37.8	0	2
M.smilacina	42.5	64.9*	0	2
3) E.purpurascens				
N.oryzae	38.7	23.1(79.3)*	0.7	3
C.cladosporioides	47.3	8.1(45.5)	0	2
A.alternata	46.2	16.8	0	1
C.martiniae	28	5.2(36.2)	0	2
Z.eucalypti	29.1	21.9	1	3
M.smilacina	50.3*	15.5(73.7)*	0	1
4) N.oryzae				
A.alternata	46.4	7.4(25)	0	—
E.purpurascens	55*	14.5	0.7	3
C.cladosporioides	30.7	1.8	0	2
5) M.smilacina				
A.alternata	35.4	15.8	0	1
C.cladosporioides	58.1*	2.9(10.8)	0	2
E.purpurascens	41.3	11.6	0	1
C.martiniae	3.4	3.4	2.7	5
Coniothyrium sp.	23.9	6.6(12.5)	0	2

	ICR	ICR _{cf}	d	D
6) C.martiniae				
A.alternata	20	30.7(36.5)	2	3
E.purpurascens	53.7*	48.5(71.8)*	0	2
M.smilacina	26.5	41.2	2.7	5
Z.eucalypti	43.3*	24.6	0.7*	3
Coniothyrium sp.	52*		2*	3
7) Coniothyrium sp.				
A.alternata	48.7*	26.2	1*	3
Z.eucalypti	53.5*	34.7	1.5*	4
M.smilacina	21.7	35.3	0	2
C.martiniae	35		2	3
8) Z.eucalypti				
E.purpurascens	57.1*	4.8(10.1)	1*	3
A.alternata	50*	10.5	1*	3
C.martiniae	32.4	26.5	0.7	3
Coniothyrium sp.	28.8	1.1(12.1)	1.5	4

* indica alta sensibilidad

() los números entre paréntesis indican los valores de ICR_{cf} en el punto B (Fig.2).

Por otra parte, resulto sensitivo respecto a ciertos endofitos (Coniothyrium sp., Z.eucalypti y C.martiniae).

A.alternata es un hongo del filoplano, de alta frecuencia y exhibe minimas variaciones estacionales de su frecuencia. Penetra en la hoja en los estados maduros y senescentes (Cabral, 1985).

Como señalamos anteriormente (ver pág.80), A.alternata podria comportarse como endofito, ubicándose en las cámaras subestomáticas, e impidiendo desde allí el ingreso de patógenos.

C.Cladosporioides

No muestra efectos significativos respecto a otros hongos del filoplano pero fue antagonista respecto de M.smilacina cuando se utilizó el test de celofán, pero en el enfrentamiento con este último resultó sensitivo, tal vez debido al rápido crecimiento de M.smilacina.

C.cladosporioides fue registrado por Cabral (1985) como hongo epifilo, con frecuencias de infección similares a las de A.alternata. Es una especie de otoño-invierno y similarmente a A.alternata ingresa en la hoja cuando ésta comienza a secarse.

De acuerdo con O'Donnell y Dickinson (1980) ambos hongos pueden ser colonialistas iniciales, capaces de

invadir hojas vivas, previo a la senescencia de las mismas . Probablemente ésta sea una estrategia para protegerse de las condiciones ambientales (Riesen, 1985).

E.purpurascens

Resultó antagonista de N.oryzae, M.smilacina y sensible respecto de A.alternata, C.martiniae y Z.eucalypti.

E.purpurascens es un hongo del filoplano y se presenta con baja frecuencia, comportándose como una especie otoño-invernal (Cabral, 1985)

N.oryzae

Es antagonista de E.purpurascens, pero sensitiva (ICR₅₀ 79.3) respecto de ésta cuando crece separadamente. No hubo resultados significativos con respecto a A.alternata y C.cladosporioides.

N.oryzae es una especie del filoplano, tropical (Hudson, 1968) y sobre E.yiminalis es esporádica y de baja frecuencia (Cabral, 1985). Por esto último, la probabilidad de competencia con otros epifilos es baja.

M.smilacina

Tiene efectos antagonistas con respecto a C.cladosporioides y es sensitiva respecto de C.martiniae y E.purpurascens.

M.smilacina es un hongo endofito, pero también se aisló de filoplano. Tal vez su alto rango de crecimiento, le permite crecer en el filoplano y dentro de la hoja, independientemente de su sensibilidad a hongos epifilos (como E.purpurascens y C.cladosporioides) y endofilos (C.martiniae).

C.martiniae

Es antagonista de A.alternata y E.purpurascens, M.smilacina, Coniothyrium sp., pero menos de Z.eucalypti.

Junto con Coniothyrium sp. son las especies endofíticas de mayor frecuencia sobre E.viminalis.

Coniothyrium sp.

Resultó antagonista de A.alternata y Z.eucalypti, y sensitivo respecto de C.martiniae.

Coniothyrium sp. es una especie típicamente estival, mientras que C.martiniae es una especie otoño-invernal. Estas diferencias estacionales reducen la probabilidad de competencia entre ellas (Cabral, 1985).

Z.eucalypti

Fue antagonista de hongos epifilos y sensitiva respecto de los endofitos. Es un hongo endofito, de baja frecuencia y se presenta en otoño-invierno, cuando las condiciones de temperatura le son más favorables (Cabral y

Bertoni, 1984). Su baja frecuencia puede ser el resultado de su sensibilidad a otros endofitos (C.martiniae y Coniothyrium sp.).

Discusión

Rayner y Todd (1979) consideran que las interacciones que ocurren en la naturaleza pueden ser interpretados satisfactoriamente en términos de interacción directa entre diferentes micelios, aunque reconocen que existen diferencias físicas entre el micelio fúngico que crece en la naturaleza y en cultivo, donde un crecimiento denso, mostraría antagonismo entre hifas, mientras que en la naturaleza puede ser más difuso y el antagonismo menos evidente. Por otra, la difusión de metabolitos solubles sería mayor en el agar.

Dickinson y Skidmore (1976), trabajando con Septoria nodorum y otros hongos del filoplanio, mostraron que el resultado de la interacción era más marcado sobre celofán que sobre hojas. Esto podría explicarse si el celofán aporta materiales nutritivos (Skidmore y Dickinson, 1976) o si previene la difusión de sustancias a través de él (Cercós, com.per.)

Cuando el hongo pasivo crece pobremente, uno podría suponer que el hongo activo produjo sustancias antibióticas. Sin embargo, tal comportamiento también puede

deberse al empobrecimiento de los nutrientes en el medio por el hongo activo, o porque el pH se hace desfavorable para el crecimiento del hongo pasivo (Skidmore y Dickinson, 1976).

Boddy et al (1985) sugieren que existe un balance delicado dentro de las comunidades donde, si las condiciones del microambiente cambian, se altera la capacidad competitiva de un hongo respecto de otro.

En nuestro caso, la interacción entre hongos superficiales indica débil antagonismo entre ellos, coexistiendo en el filoplano sin interferencia pronunciada entre sus hifas, y tolerando el desarrollo de las especies adyacentes (Skidmore y Dickinson, 1976).

Entre los endofitos, las especies de alta frecuencia tienen efectos antagonistas respecto de las de baja frecuencia y, de este modo, transforman el interior de la hoja en un habitat poco adecuado para ellas.

Podemos observar que los pares de hongos donde uno o ambos son endofitos (tabla 9) muestran tipos de reacción D3 a D5, mientras que los pares integrados por *M.smilacina* (integrante también del filoplano) y hongos epifilos muestran tipos de reacción D1 y D2. Esto sugiere que la exclusión de los epifilos del interior de la hoja puede deberse al antagonismo de los endofitos.

Los endofitos pueden ser antagonistas de patógenos, retardando o inhibiendo su crecimiento (White y Cole, 1985) o cuando ellos no presentan antagonismo directo podrían inducir en el hospedante la producción de sustancias específicas que incrementan la resistencia del mismo (Siegel et al., 1985). En este sentido Mansfield et al. (1975) sostiene que la penetración fúngica en la epidermis es un prerequisite para la producción de fitoalexinas, que podrían restringir el crecimiento fúngico dentro de la hoja.

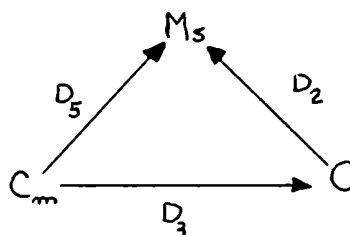
P. oblonga (endofito del olmo) tiene un efecto sustancial como competidor sobre el patógeno C. ulmi, y no sólo excluye a C. ulmi, sino que es un depresor del desarrollo de la población de Scolyptus sp. (Webber y Hedger, 1986) y puede ser considerado como parte del mecanismo de control biológico natural para el coleóptero (Webber, 1981).

Por otra parte, la interacción interespecífica entre hongos es útil potencialmente para comprender el desarrollo de la comunidad. Las colonias fúngicas que crecen en proximidad pueden inducir entre ellas cambios tales como, estimulación, alteraciones morfológicas y grado de inhibición, que determinarían competencia, modelos de colonización y estructura de la comunidad (Skidmore y Dickinson, 1976).

Teniendo en cuenta los resultados experimentales, y considerando que la interacción en la naturaleza puede ser comprendida examinando las comunidades unidades (Cooke y Rayner, 1984), podemos bosquejar un modelo de interacción de tres especies (Culver, 1981).

Este modelo que se propone estaría ejemplificado por las especies M.smilacina (Ms), C.martiniae (Cm) y Coniothyrium sp.(C), que coexisten entre sí en la hoja, y constituyen las especies principales del patrón de comunidad unidad Pa (tabla 7).

Según la tabla 9 los grados de reacción de las interacciones entre las especies consideradas varían entre D2, D3 y D5.



En el esquema anterior, la flecha indica el sentido antagonista de las especies según el resultado de la tabla 10.

En los análisis de interacción de dos especies hallamos que C.martiniae afecta a M.smilacina y en consecuencia ésta debería decrecer cuando aumenta la primera. Ejemplo de este tipo de relación puede observarse

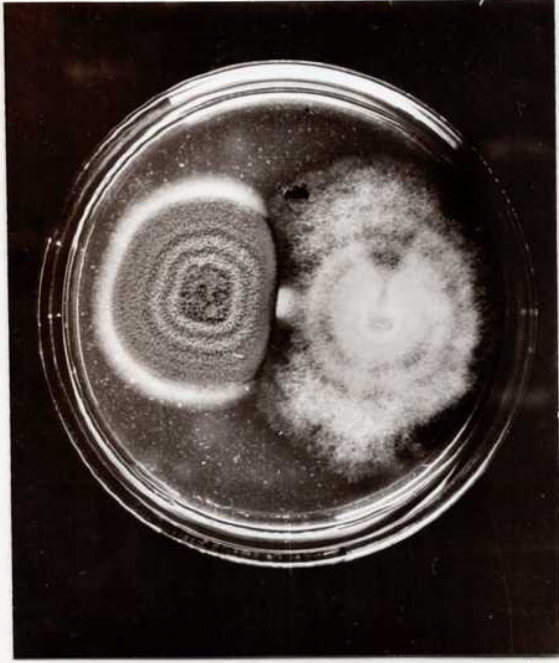
en el patron F_3 (tabla 7) donde C_m es especie principal y M_s es especie secundaria.

En el caso que interactúan las tres especies, cuando C_m aumenta, M_s puede disminuir, aumentar o permanecer igual, dependiendo de la relación entre M_s y C . En consecuencia C_m puede afectar a M_s en dos formas: a) efecto negativo directo de C_m sobre la abundancia de M_s , b) efecto positivo indirecto de C_m sobre M_s , como consecuencia del efecto negativo de C_m sobre C . Es decir, C_m reduce la abundancia de los competidores de M_s y este último puede aumentar. Para probar estos modelos uno tendría que generar una perturbación y observar el retorno hacia el equilibrio de la microcomunidad.

Lámina IX

1. Interacción de colonias entre E.purpurascens y C.cladosporioides (D₂)
2. Interacción de colonias entre M.smilacina y C.martiniae (D₅)
3. Crecimiento de C.martiniae en la caja control según el test de celofán
4. Crecimiento de C.martiniae como hongo pasivo (A.alternata como hongo activo).

Lámina IX



1



2



3



4

CAPITULO IV

ENDOFITOS EN LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS
HERBIVOROSParte I: en Baccharis coridifolia

El mio-mio o romerillo (Baccharis coridifolia D.C) es un arbusto (lam.X, Burkart, 1974) conocido como tóxico para diversos tipos de ganado (bovino, equino, ovino). Se extiende desde el sur de Brasil, Mesopotamia, centro y norte argentino hasta Rio Negro.

En las zonas endémicas el ganado conoce la planta y no la ingiere, pero si son trasladados de región la ingiere y mueren.

Murray (1862) es el primer investigador que menciona estas características de la planta, pero sólo en la segunda década de este siglo, Flores y Houssay (1917) experimentaron la toxicidad con una amplia gama de animales. Arreguine (1918) describe una técnica de extracción y purificación de las sustancias tóxicas, hasta un producto que presentaba una toxicidad constante.

En 1976 y 1977 Kupchan y colaboradores, aíslan de B. megapota mica tricotecenos macrocíclicos antileucémicos,

Lámina X

COMPUESTAS



Baccharis coridifolia DC.: a, tallo florífero masculino; b, planta femenina; c, capítulo masculino; d, flor masculina; e, antera; f, estigma de la flor masculina; g, capítulo femenino; h, flor femenina; i, estigma de la flor femenina; j, aquenio, papus cortado.

baccharinoides: baccharina, isobaccharina, baccharinol e isobaccharinol.

En 1981 Jarvis et al., demuestran que las plantas de B. megapota mica mantenidas en invernaderos y alimentadas con roridina A de origen fúngico, a través de las raíces, traslocaban rápidamente esta toxina hacia las hojas, donde eran transformadas en baccharinoide B₇.

roridinas \longrightarrow baccharinoides B₇

Por otra parte Busam y Habermehl (1982) analizando plantas de B. coridifolia, procedentes de Brasil, aíslan e identifican roridinas A y E, y atribuyen a estos compuestos la alta toxicidad que presenta la planta. Más tarde Habermehl y Busam (1984) y Habermehl et al (1985) encuentran otras toxinas: micotoxinas A,B,C,D, e isoD.

Lo sorprendente de estos resultados reside en el hecho de que tanto las roridinas como sus derivados, los baccharinoides, pertenecen al grupo de los tricotecenos macrocíclicos, micotoxinas producidas únicamente por hongos de los géneros Myrothecium, Stachybotrys, Cylindrocarpou y Verticimonosporium (Jarvis et al.1985, Ueno, 1983).

El hallazgo de baccharinoides y roridinas en plantas de Baccharis que no presentaban signos de contaminación fúngica, inició una serie de investigaciones a fin de conocer el origen de estas toxinas.

Los resultados de la experiencia en B.megapotamica, que sintetizaba baccharinoides a partir de roridinas exógenas, sugirió la existencia de una asociación estrecha entre plantas de Baccharis y hongos productores de tricotecenos.

En un principio se pensó que estos hongos, presentes en el suelo o rizosfera de la planta, producirían las toxinas que luego serían absorbidas por las plantas para acumularlas (caso de B.coridifolia) o transformarlas en baccharinoides (caso de B.megapotamica).

El análisis de suelo cercano a las plantas, mostraba la existencia de toxinas y presencia de cepas fúngicas como Cylindrocarpum y Myrothecium. Pero estos hongos en cultivo no eran capaces de producir la toxina (Jarvis, 1986). Por otra parte estos aislamientos sólo constituían el 1% del total de cepas fúngicas aisladas (Jarvis et al, 1987). Ninguno de los resultados obtenidos aseguraba sin lugar a dudas, que ésta era en última instancia la fuente de micotoxinas.

Estudios más recientes (Jarvis et al., en prensa) sostienen la hipótesis de la síntesis de novo por las plantas de B.coridifolia, que habría adquirido evolutivamente genes productores de las toxinas, originarios de Myrothecium. Este origen parece dudoso, en razón de que los genes que codifican la síntesis de tricotecenos, están dispersos en varios cromosomas (Jarvis et al, en prensa), y

es difícil imaginar como pudo ocurrir la transferencia de todos ellos.

Nosotros postulamos que no habría síntesis de novo por la planta, sino que endofitos presentes en Baccharis, serían los responsables de la síntesis de las toxinas. Como primer paso de esta hipótesis intentamos demostrar la existencia de endofitos en B.coridifolia, y en segundo lugar comprobar la presencia de tricotecenos macrocíclicos en las plantas y su producción por endofitos de B.coridifolia.

1) Presencia de endofitos

Materiales y Métodos

El relevamiento de los endofitos fué realizado sobre tres poblaciones de B.coridifolia. Dos de ellas ubicadas en la provincia de Entre Ríos, departamento de Gualeguaychú, una en el camino al Ñandubaysal y la otra en campo Baggio, en Urquiza oeste a pocos km de la ruta 14. Ambos sitios distantes entre sí aproximadamente 20 km.

La tercera población se ubica en Magdalena, provincia de Buenos Aires.

Los muestreos se realizaron en marzo de 1987 y mayo de 1988 para las dos primeras poblaciones, y en marzo de 1988 para la tercera. De cada población se muestrearon 10 plantas, que se diferenciaron en masculinas y femeninas. Se

llevaron al laboratorio en bolsas plásticas individuales y se procesaron no más allá de las 48 hs posteriores a la recolección.

De cada planta se extrajeron al azar 15 hojas, que se lavaron con agua corriente previamente a la esterilización. Esta se realizó según las técnicas habituales ya mencionadas (pág.66). Luego, de cada hoja esterilizada se extrajo al azar un trozo de 1 mm x 3 mm.

De las mismas plantas se tomaron 5 tallos y de cada uno se cortó al azar tres trozos de 3 mm, que fueron lavados y esterilizados como se señaló anteriormente. Las estructuras que mostraron signos visibles de invasión fúngica, fueron desechadas.

Los trozos esterilizados de hoja como de tallo, pertenecientes a una misma planta, fueron sembrados separadamente en cajas de Petri con agar-agua al 2%, y cultivados en condiciones de temperatura ambiente y luz diurna.

Periódicamente, durante tres semanas se revisaron los cultivos, y se aislaron los micelios en tubos con medio de malta 2%. La identificación de los endofitos aislados se realizó tanto sobre el aislamiento original, como sobre subcultivos en medios sintéticos y semisintéticos standards. En los casos de cepas que no fructificaron en estas condiciones, se ensayó la irradiación de los cultivos con

luz ultravioleta cercana y la siembra en medio de agar-agua al 2% con hojas de B.coridifolia. Esto dió resultados positivos en gran número de cepas, aunque otras no fructificaron con estos métodos y se identificaron como micelio estéril. Sin embargo, debido a las características de cultivo pudieron ser identificados como pertenecientes a una misma especie.

Los resultados fueron registrados como frecuencias (%) de infección de cada especie en cada uno de los sitios muestreados, teniendo en cuenta el número de veces en que aparece una especie dada por el número total de submuestras consideradas.

Resultados

En la tabla 11 se volcaron los resultados de la frecuencias de aislamiento (%) discriminados por población y estructura analizada. No se presentan los resultados obtenidos en plantas masculinas y femeninas por separado debido a que éstos no mostraron diferencias apreciables entre los dos grupos.

B.coridifolia esta colonizada por un espectro de endofitos que puede dividirse en cuatro grupo de especies: el primero formado por aquéllas con frecuencias altas y presentes en todos los sitios y estructuras muestreadas, representado únicamente por A.alternata. Un segundo grupo con frecuencias relativamente bajas pero presentes en todos

Tabla 11 : Frecuencias (%) de los endofitos encontrados en hoja (H) y tallo (T) de B.coridifolia

	Ñandubaysal			Baggio			Magdalena		
	H	T	Tot.	H	T	Tot.	H	T	Tot.
<u>Alternaria alternata</u>	35.3	52.4	23.8	35	33.3	48.1	68.3	60.2	65
<u>Mycosphaerella sp.</u>	4	0	2.6	0	0	0	1.6	0	0.9
<u>Ceratopycnidium bacchariicolium</u>	2.3	0	1.5	6.8	0	5	4.1	0	2.4
<u>Phomopsis sp.</u>	0.6	0	0.4	0.6	2	1.8	11.6	33.7	20.6
<u>Pleospora sp.</u>	0.6	0	0.4	0	0	0	2.5	1.2	1.9
<u>P.calvescens</u>	0.6	2.7	1.3	0	0	0	1.6	0	0.9
<u>Phoma sp.</u>	0.3	0.6	0.4	0	9.3	6.3	0	1.2	0.4
<u>Colletotrichum acutatum</u>	0.3	0	0.2	0	0	0	0	0	0
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	0.3	0	0.2	0	0	0	0	0	0
<u>Nigrospora sp.</u>	0.3	0	0.2	0	0	0	0	0	0
<u>Pestalotiopsis sp.</u>	0	0.6	0.2	0	0	0	0	0	0
<u>Curvularia sp.</u>	0	0.6	0.2	0	0	0	0	0	0
<u>Cytospora aff.chryso sperma</u>	0	0.6	0.2	0	0	0	0	0	0
<u>Ulocladium sp.</u>	0	0	0	0	0.6	0.4	6.6	0	3.9
<u>Myrothecium striatisporium</u>	0	0	0	0	0	0	0	1.2	0.4
<u>Dreschlera sp.</u>	0	0.6	0.2	0	0	0	0.8	1.2	0.9
Micelio estéril FR	8	0.6	5.6	6.2	1.3	5.4	0.8	0	0.5
Total de frecuencias	52.8	58.7	37.4	48.6	46.5	67	97.9	98.7	97.8

los sitios, aunque no en todas las estructuras, entre los que podemos incluir a Ceratopycnidium bacchariicicolum (especie nueva, descripción en el apéndice), Phomopsis sp., Phoma sp. y micelio estéril FR. Es interesante notar que en el caso de C.bacchariicicolum fué aislado únicamente de las muestras de hojas. Un tercer grupo incluye a especies que aparecen regularmente en sólo dos de los tres sitios muestreados, como es el caso de Pleospora sp., Pleospora calvescens y Mycosphaerella, y un último grupo formado por especies esporádicas, de baja frecuencia, que comprende al resto de las especies aisladas.

2) Presencia de tricotecenos macrocíclicos en plantas y endofitos de B.coridifolia (en colaboración con la Dra.E.Varsavsky)

Materiales y Métodos

I) Análisis de las plantas de las poblaciones de Magdalena (Bs.As.) y Gualeguaychú (E.Rios)

Extracción: las plantas, incluidas las flores, y por otra parte las semillas, fueron machacadas en mortero, utilizándose para el análisis químico el método de Jarvis et al.(1985).

A un gramo de la muestra se la extrajo con 5 ml de metanol en sonicador, durante 10 min. La mezcla se filtró a

través de papel de filtro (Whatman nº 1) y luego el filtrado se evaporó por rotavapor.

El extracto seco se resuspendió en 1 ml de diclorometano y una alícuota de la solución se pasó por una columna de limpieza rellena con 3 cm de silicagel 60, usando diclorometano.

Las toxinas fueron eluidas con 8 ml de metano al 5% en diclorometano. Luego de la evaporación de la solución, el extracto seco se resuspendió en 100 µl de diclorometano.

Análisis por cromatografía en capa delgada (TLC): los extractos obtenidos se sembraron en placa de silicagel 60 con indicador de fluorescencia 254. Se desarrollaron en clorotormo-acetona (93+7) y las placas fueron observadas bajo luz ultravioleta de 254 nm. Este análisis fue confirmado por B.B.Jarvis utilizando la metodología de HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia).

II) Análisis de la producción de tricotecenos por endofitos

De los endofitos aislados, cuatro se presentan en todas las poblaciones de plantas estudiadas: A.alternata, C.bacchariicolum, Phomopsis sp. y micelio estéril FR, y fueron considerados por nosotros como los que tienen mayor probabilidad de establecer una relación mutualista con el

hospedante. Sobre éstos se realizó el análisis de producción de tricotecenos macrocíclicos, a excepción de A.alternata porque en esta especie es conocida la producción de una gran variedad de metabolitos, ninguno de los cuales pertenece al grupo de los tricotecenos macrocíclicos (King y Schade, 1984).

También se analizó la cepa de Myrothecium striatisporium, teniendo en cuenta que las especies M.rocidinum y M.verrucaria son productoras de voridinas y verrucarinas, respectivamente.

Se ensayaron 10 cepas, una de cada una de las siguientes especies: Phomopsis sp., Myrothecium striatisporium y micelio estéril FR, y 7 de Ceratopycnidium bacchariicicolum. Estas cepas fueron cultivadas en:

- a) medio B (Jarvis et al.1985)
- b) medio de arroz con 75% de agua
- c) medio A (Jarvis et al.1985)
- d) medio Yes (sacarosa 15%, extracto de levadura 2%)

Estos cultivos fueron incubados en condiciones de luz diurna y temperaturas de 23-25°C (durante 8 días) y 13°C (durante 22 días)

La extracción se realizó con metanol-agua (1+1) y posterior limpieza con hexano. Se evaporó la fase metanólica y se redisolvió en diclorometano.

Análisis en TLC: idem anterior

III) Bioensayo con Artemia salina

El extracto fúngico fue probado para su toxicidad en A. salina. Los crustáceos fueron criados en solución (1,5% ClNa, 1g de borax) durante 2 días, y ubicados sobre las muestras en las placas de ensayo. Al cabo de 24-48 hs. el porcentaje de mortalidad indicó la presencia o ausencia de toxinas (Harrach, 1988).

Resultados

1) Aunque desde 1862 se conoce en la Argentina la toxicidad de estas plantas hacia el ganado, nunca antes se había realizado el análisis de la presencia de tricotecenos en material del país.

Las poblaciones de Entre Ríos y Buenos Aires, mostraron en los extractos vegetales, presencia de roridinas A y E, y verrucarinas A y J, tanto por TLC (lam.XI) como por HPLC.

El análisis de HPLC (lam.XII) muestra el tiempo de retención y la concentración relativa de cada una de las

Lámina XI

Foto de la corrida cromatográfica (TLC)

Se menciona de izquierda a derecha los puntos de siembra de los extractos;

189 (cepa 2514); 189 + standard interno (st);

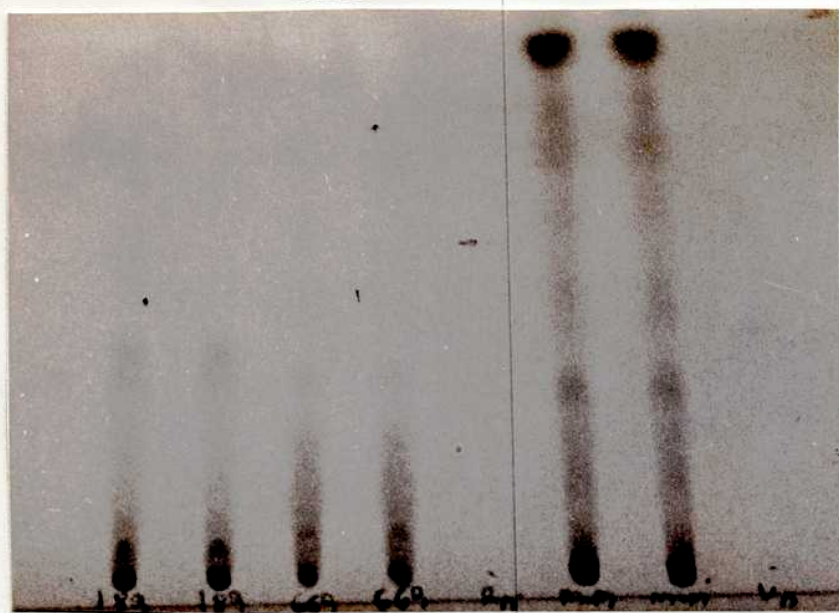
669 (cepa 2512); 669 + st.; standard de roridinas

A (RA) y E (RE); extracto de plantas de B.coridi-

folia (mm); mm + st.(de roridinas y verrucarinas);

st.de verrucarinas A (VA) y J (VJ).

Lámina XI

Tabla 12 Resultados según TLC y A.salina (bioensayo)

Endofitos	TLC		A.salina
	Roridinas	Verrucarinas	
<u>Myrothecium striatisporium</u> 2523			
Mi celio esteril FR			+
<u>Phomopsis</u> sp. A-E 2527		A-J	+
<u>C.bacchariicolum</u>			
2502	A	A	+
2509	A?		
2511			
2512	A-E	J?	
2514	E		
2518			
2520			

Lámina XII

HPLC de plantas de B. coridifolia

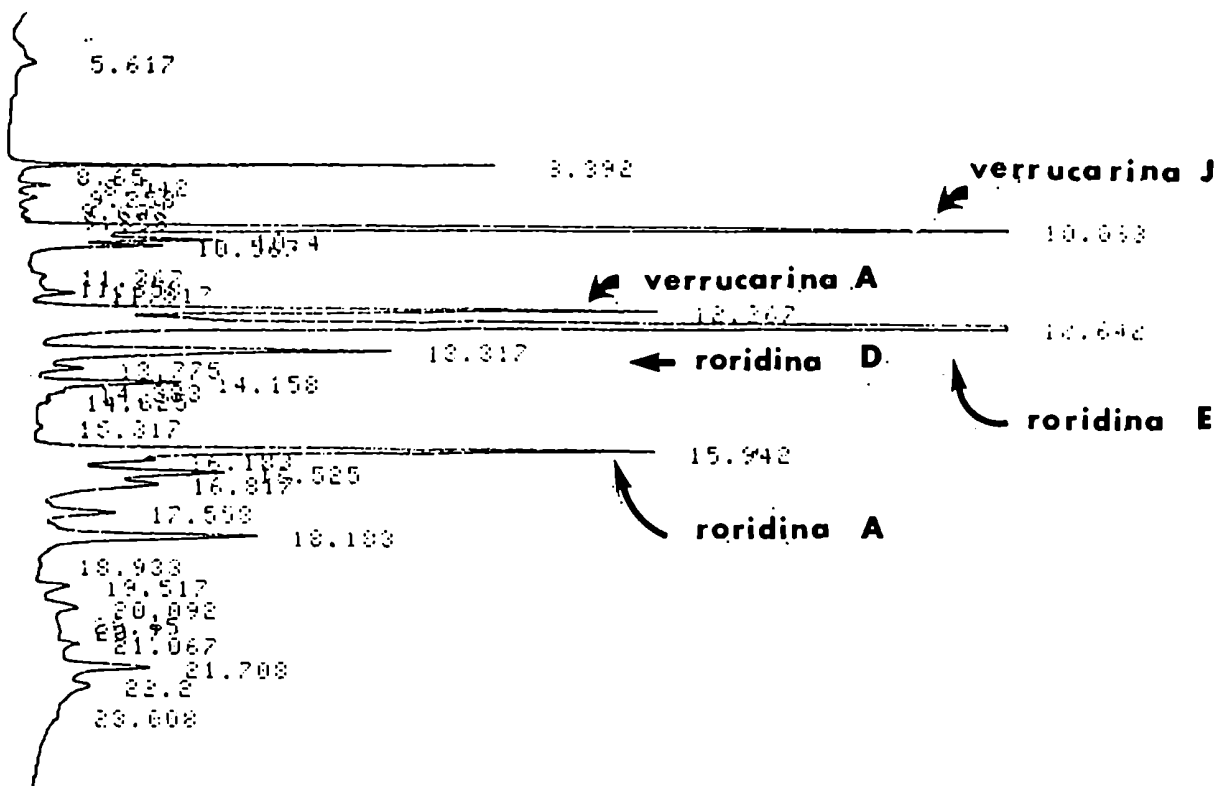
(gradiente de hexano, Cl_2Cl_2 , isopropanol)

flujo: 1,2 ml/min.

columna: 5 u Baker

detector de UV 264 nm

cortesía: Dr. B. B. Jarvis



CHROMATOGRAPH C-REA
 SAMPLE NO 9
 REPORT NO 2488

FILE 0
 METHOD 0041

PKNO	TIME	AREA	IDNO	CONC	NAME
1	2.933	48441		1.0704	
2	3.092	65249	V	1.4418	
3	8.392	99033		2.1883	
4	8.942	14669	V	0.3242	
5	9.258	12044	V	0.3661	
6	10.083	594630	V	13.1397	-v J
7	10.4	106655	V	2.3568	
8	10.567	60746	V	1.3423	
9	11.367	11011		0.2433	
10	11.817	20905	V	0.4619	
11	12.267	319706	V	7.0646	-v A
12	12.642	1296474	V	28.6484	-r E
13	13.317	241464	V	5.3357	-r D
14	13.775	28868	V	0.6373	
15	14.158	84453	V	1.8662	
16	14.383	16331	V	0.3609	
17	15.942	397897		8.7924	-r A
18	16.183	61698	V	1.3633	
19	16.525	165976	V	3.6676	
20	16.817	132771	V	2.9339	
21	17.558	61939	V	1.3685	
22	18.183	189643	V	4.1906	
23	19.517	27660		0.6112	
24	20.092	54529	V	1.2049	
25	20.45	17314	V	0.3826	
26	20.7	34825	V	0.7651	
27	21.067	50167	V	1.1086	
28	21.708	144728	V	3.1981	
29	22.2	110234	V	2.5019	
30	23.008	52625	V	1.1625	

toxinas. Los tricotecenos que están en mayor concentración son roridina E y verrucarina J. En este análisis se detecta también roridina D, de la que se conocía su existencia en material de E.coridifolia de Brasil (Jarvis, en prensa).

II) y III)

De los datos de la tabla 12, podemos observar que H. latissporium y micelio estéril FR, no producen tricotecenos macrocíclicos "in vitro", aunque la última especie presenta toxicidad en el ensayo con A.salina.

En cambio Phumopsis sp. mostró producción de roridinas A y E, y verrucarinas A y J, así como toxicidad en el bioensayo.

De las 7 cepas de C.bacchariicola, 3 de ellas dieron resultados negativos tanto para los tricotecenos como para el bioensayo. De las restantes, la cepa 2502 produce roridinas A y verrucarina A, y toxicidad con A.salina. La cepa 2509 produciría roridina A, pero el resultado no es seguro. La cepa 2512 produce roridinas A y E, y tal vez verrucarina J, y la cepa 2514 produce sólo roridina E. En la placa de TLC de la lámina XI se observa la corrida cromatográfica de las toxinas de las cepas 2512 y 2514.

Discusión

1) Aislamiento de los endofitos

De la observación de estos resultados surge que, con excepción de A.alternata, el resto de las especies aisladas, a pesar de comportarse como ubicuotas sobre la planta, fueron aisladas con frecuencias bajas. Ello puede ser el resultado de una baja colonización del hospedante, o de un enmascaramiento debido a la presencia de A.alternata en la muestra.

De ellos Alternaria alternata, C.bacchariicolum, Phomopsis sp, y micelio estéril FR, y en menor grado Pleospora sp. y Phoma sp. cumplen con algunas de las características mencionadas por Carroll (1986) sobre los endofitos mutualistas. Es decir, se encuentran siempre presentes en la planta, no parecen afectar mayormente al hospedante, ya que las hojas y tallos analizados fueron seleccionados entre los que no presentaban ningún tipo de manifestación visible de infección, y por último, tanto Phomopsis sp. como Pleospora sp son reconocidos endofitos ubicuotas de comportamiento mutualista (Petrini, 1986; Carroll, 1986).

De las otras dos especies, C.bacchariicolum es un nuevo taxón (Bertoni y Cabral, 1989), y micelio estéril FR no ha podido ser identificado debido a la falta de estructuras fértiles.

Conociendo la relación que existe entre endofitos mutualistas y la producción por ellos de toxinas contra

herbivoros, decidimos utilizar estas especies para los ensayos de producción de tricotecenos macrocíclicos.

2) Análisis de la presencia de tricotecenos macrocíclicos

Las especies micelio estéril FR y M.striatisporium no producen tricotecenos macrocíclicos "in vitro". En cambio Phomopsis sp. y las cepas 2502, 2512 y 2514 de C.bacchariicolum, producen roridinas A y E y verrucarinas A y J.

Por otra parte, los extractos de las plantas también muestran la presencia de estas roridinas y verrucarinas, a las cuales se atribuye la toxicidad que presenta B.coridifolia (Busam et al.,1982).

A partir de estos resultados, parece lógico suponer que el origen de las toxinas que se hallan en B.coridifolia, se debe a la producción de las mismas por endofitos fúngicos tales como Phomopsis sp. y C.bacchariicolum.

Estas dos especies pasarían así a integrar el grupo de los hongos productores de tricotecenos macrocíclicos, junto a los géneros: Myrothecium, Verticimonosporium, Cylindrocarpus y Stachybotrys.

El hallazgo de Phomopsis sp. y de C.bacchariicolum, como endofitos, y como productores de roridinas y verrucarinas, confirmaría nuestra hipótesis inicial sobre:

- 1) la existencia de endofitos en B.coridifolia
- 2) la producción por endofitos de tricotecenos macrocíclicos

Este es el primer resultado positivo en las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, acerca del posible origen de los tricotecenos macrocíclicos, responsables de la toxicidad de B.coridifolia para el ganado.

Por otra parte, la producción de estas toxinas por endofitos en simbiosis mutualista con el hospedante, es otro ejemplo del papel de estos organismos en la resistencia del hospedante a los herbívoros.

APENDICE

Ceratopycnidium bacchariicolum Bertoni & Cabral
(en prensa).

Colonia en agar agua y trozos de H. coridifolia, de crecimiento lento, alcanzando 30-35 mm de diám. en 30 días, a temperatura ambiente (20-25°C) y luz natural. Micelio en su mayor parte sumergido, hialino, formado por hifas delgadas, hialinas, con zonas castaño a castaño verdosas, con hifas más gruesas, castaño claras. Porción central de la colonia, con manchones de micelio aéreo, blanco grisáceo, algodonoso laxo. Conidiomata picnidial, semi inmersos en el tejido del hospedante o en el agar circundante; base globosa, castaño oscura, monoestratificada, de textura angularis, hasta 40 u diám. Cuello largo, uno a raramente dos, 98-118 u de largo, castaño, aclarándose hacia el ápice que puede ser hialino, textura paralela prismática, ostiolo simple, fimbriado. Conidióforos ausentes. Células conidiógenas, holoblásticas, simpodiales, indeterminadas, hialinas, 1-2 proliferaciones simpodiales. Conidios hialinos, lisos, de pared delgada, elipsoidales a cilíndricos, derechos o curvados, 0-3 septados, poco o nada constreñidos en los septos. Conidios 0 septados (4,8-8 x 1,6-1,9 u), 1 septados (12,8-16 x 1,6-2,4 u), 2 septados (16-19,2 x 1,6-1,9 u), 3 septados (16-20 x 1,9 u). Los conidios también pueden formarse libres en el micelio aéreo

o sumergido, en células conidiógenas similares a las descritas para el picnidio, o más reducidas.

Ejemplares examinados: holotipo, BAF 91902;
isotipo, IHI 327489.

Teleomorfo: desconocido

Lámina XIII

1-3. Etapas en el desarrollo del picnidio

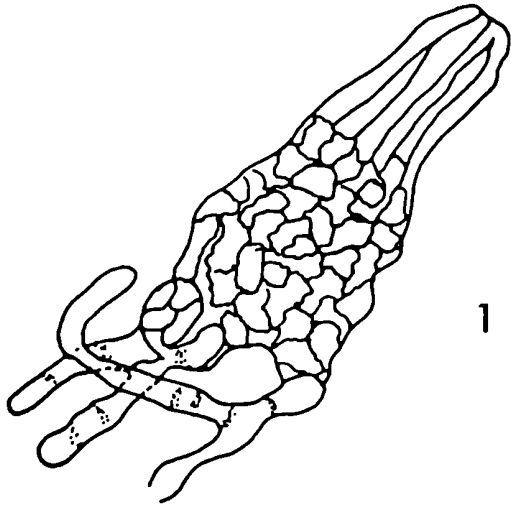
3. Picnidio maduro

4. Interior del picnidio con células conidió-
genas y conidios en formación

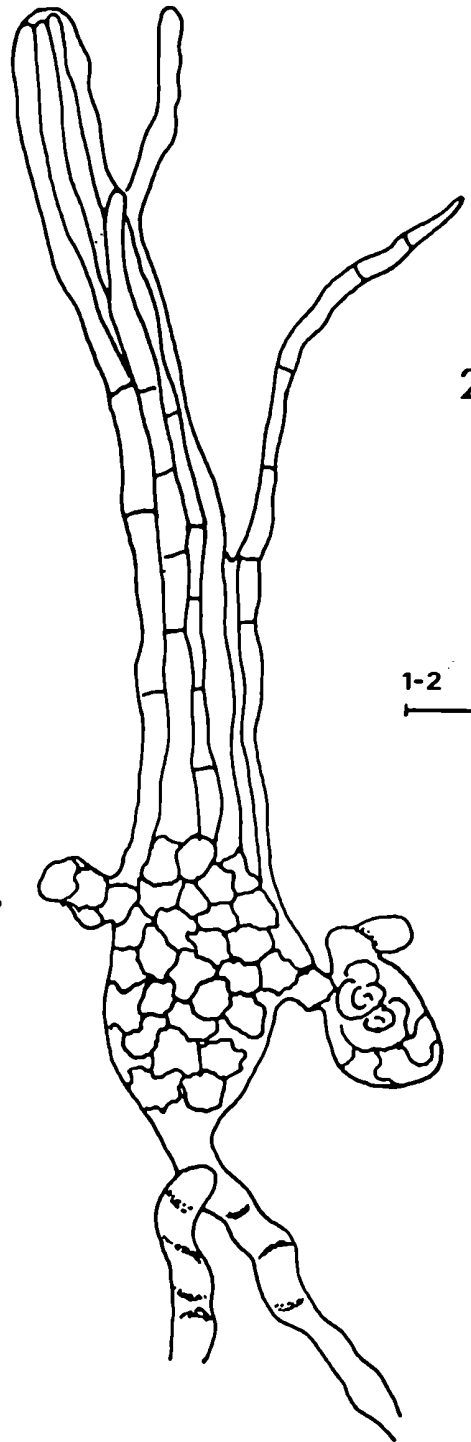
5. Formación de conidios en el micelio aéreo

6. Conidios 0-3 septados

Lámina XIII

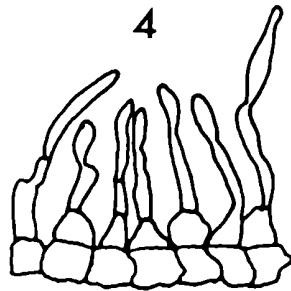


1

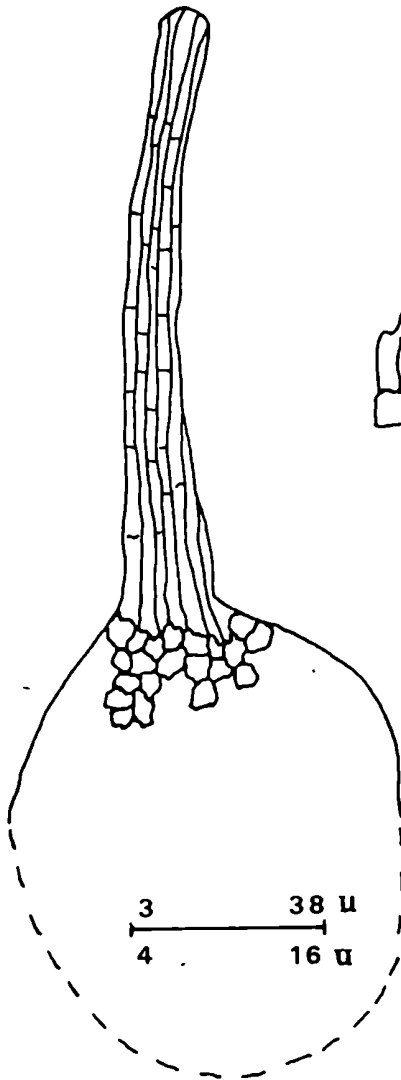


2

1-2 20 u



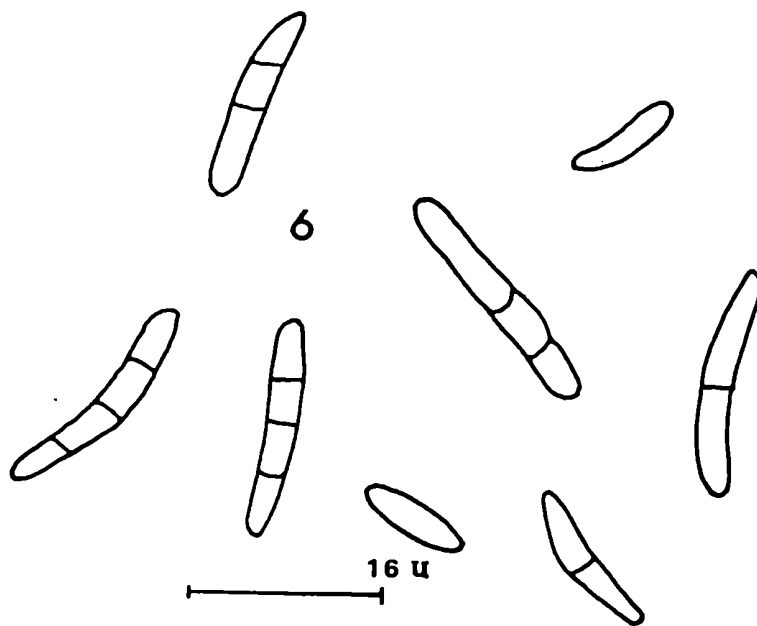
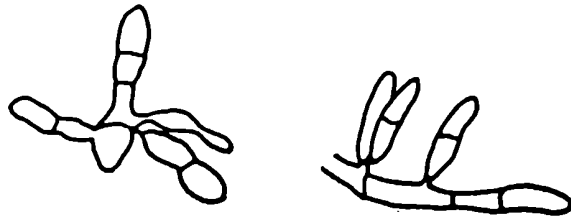
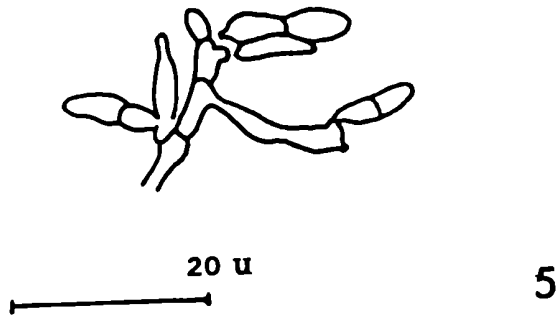
4



3

3 38 u
4 16 u

Lámina XIII (cont.)



CAPITULO IV (continuación)

ENDOFITOS EN LA RESISTENCIA DE LA PLANTA A LOS
HERBIVOROS

Parte 2: en Festuca spp.

Desde hace tiempo se conoce la presencia de endofitos fúngicos en los tejidos de muchos vegetales, pero es tan sólo en los últimos años que se asocia esta presencia con los efectos sobre los insectos y mamíferos herbívoros.

Los hongos de la familia Clavicipitaceae, tribu Balansiae, infectan plantas de las familias Poaceae, Cyperaceae y Juncaceae. En esta tribu hay 5 géneros con alrededor de 30 especies: Atkinsonella, Balansia, Balansiopsis, Epichloe y Myriogenospora. A semejanza de Claviceps, también producen ergocalcoides.

Los endofitos del género Acremonium está muy relacionados con la tribu Balansiae (ej. A.typhinum es el anamorfo de Epichloe_typhina), pero son anamorfos con teleomorfos desconocidos. Estos endofitos nunca fructifican sobre el hospedante y dependen totalmente de él para su diseminación. Esta es una asociación mutualista donde un organismo está contenido dentro de otro organismo, y la selección opera contra la reproducción del endobionte, por

lo cual éste se halla en proceso de perder su capacidad reproductiva (White y Cole, 1986; White, 1988).

Se han aislado en pastos 6 especies de Acromonium que se encuentran como endofitos: A.huerfanum (en Festuca arizonica), A.chisosum (en Stipa_eminens), A.typhinum (en F.arundinacea), A.coenophialium (en F.arundinacea), A.lolii (en Lolium_perenne) y A.starii (en F.arizonica, F.obtusa y F.subulata).

En el género Festuca se han analizado 18 especies y 8 subespecies, encontrándose endofitos en 10 de ellas (tabla 13).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, planteamos el estudio de varias especies de Festuca del norte y sur de nuestro país, con el fin de comprobar la existencia de endofitos y correlacionar esta presencia con la toxicidad de estas plantas para los herbívoros.

Materiales_y_métodos

Las especies examinadas y sus localidades se detallan en la tabla 14.

Observación de los endofitos

a) en semillas

Las semillas se trataron primeramente con una solución de HONa al 5%, durante 16 a 20 horas a temperatura

Tabla 13. Datos sobre la presencia de endofitos en especies de *Festuca* sp.

<i>Festuca arizonica</i> Vasey	+ (1)	+ (4)
<i>Festuca duriscula</i>	- (5)	
<i>Festuca eastwoodea</i> Piper	+ (1)	
<i>Festuca elatior</i> L.	+ (1)	+ (3)
<i>Festuca glauca</i>	+ (3)	- (5)
<i>Festuca idahoensis</i> Elmer	- (1)	
<i>Festuca ligulata</i> Swallen	+ (1)	
<i>Festuca longifolia</i> Thvill	+ (5)	
<i>Festuca obtusa</i> Spreng	+ (1)	+ (4)
<i>Festuca ovina</i> L.	- (1)	+ (5)
<i>Festuca ovina</i> var. <i>bracklyphylla</i> (Schult) Piper	- (1)	
<i>Festuca ovina</i> var. <i>pseudoovina</i> Hack	- (1)	
<i>Festuca ovina</i> var. <i>sulcata</i> Hack	- (1)	
<i>Festuca ovina</i> subsp. <i>vallesiaca</i>	+ (5)	
<i>Festuca pacifica</i> Piper	+ (1)	
<i>Festuca paradoxa</i> Desv.	+ (1)	
<i>Festuca pratensis</i> Huds.	+ (6)	
<i>Festuca p.</i> var. <i>apennina</i>	+ (6)	
<i>Festuca pseudoovina</i>	- (1)	
<i>Festuca rubra</i> L.	- (1)	+ (5)
<i>Festuca r.</i> subsp. <i>commutata</i> Gaud.	+ (5)	
<i>Festuca r. litoralis</i>	+ (5)	
<i>Festuca scabrella</i> Torr.	+ (1)	
<i>Festuca subulata</i> Trin.	+ (1)	
<i>Festuca versuta</i> Beal.	+ (1)	+ (2)

(1) White y Cole (1985).

(2) White y Cole (1986).

(3) Morgan-Jones y Gauss (1982).

(4) White y Morgan-Jones (1987).

(5) Saha et al. (1987).

(6) Latch et al. (1987)

ambiente, a fin de ablandarlas, y luego se lavaron cinco veces en agua de canilla. Una vez tratadas, previa extracción de las glumas, se colorean con azul de anilina (Clark et al, 1983) y se dejan en reposo durante 10 min. Cada semilla (20 en total) se analiza separadamente, colocándola sobre un portaobjetos y presionando suavemente con el cubreobjetos.

b) en vaina

La zona de la vaina utilizada para la observación, es la zona inferior acolorótica. De la parte interna se retira una sección de epidermis, quedando expuesta la zona parenquimática. De esta última se toma una porción con una pinza de punta fina y se la colorea durante unos minutos con azul de anilina. Luego se observa.

Aislamiento de los endofitos

a) a partir de vaina

Material: E. argentina (648; 675: paso Córdoba).

Las vainas de las plantas en las cuales se comprobó la presencia de endofitos, fueron lavadas en agua corriente, y luego seccionadas en trozos de 3 cm. Estos trozos fueron esterilizados superficialmente con hipoclorito de sodio (80g/dm³) 10% y enjuagados en agua estéril.

Posteriormente los trozos fueron cortados longitudinalmente en dos mitades. Una se sembró directamente, y la otra se maceró antes de sembrarla.

La siembra se realizó en medio líquido (M102, Bacon, 1988) y se incubó durante 4 semanas a 24 °C en cámara de cultivo con shaker rotatorio, y en medio sólido CDSA (Clark et al.1983).

b) a partir de semillas

Material:F.arundinacea (Rio Cuarto)

F.hieronymi (694: Infiernillo, Tucumán)

F.argentina (648)

Las semillas se esterilizaron superficialmente, durante 20 minutos , en una solución de hipoclorito de sodio (80g/dm³) al 50%, con el agregado de 1,25ml/l de tween 20. Luego se lavaron con agua estéril y se sembraron en medio CSDA; medio nº 9 (Clark et al.,1983), en agar papa glucosado, y en medio líquido M102.

Resultados

La tabla 14 muestra la lista de especies y el número de poblaciones estudiadas para cada especie. Las especies Festuca sp.1; F.ampiflora; F.argentina; F.hieronymi; F.magellanica (=pyrogea); F.rubra

Tabla 14

Las poblaciones examinadas corresponden a los siguientes lugares

80:Trelew; 114:Chubut; 154:Gñadón de la Mosca (Neuquén)
168:S.M.de los Andes; 175:Sierra de la Ventana;
181:S.M.de los Andes; 193:S.M.de los Andes;
197:Iluechulafquen (Neuquén); 201:Junín de los Andes
206:Rahue (Neuquén); 208:Cuesta del Rahue (Neuquén)
210:Rahue; 213:Pino Hachado (Neuquen); 221:idem ant.
235:Las Leñas; 240:camino a Las Leñas; 230:idem ant.
241:Pehuenche (Mendoza); 244:Sgo.de Chile;
246:Manquehue (Sgo.de Chile); 249:Embalse del Yeso (Chile);
625:Las Leñas; 622:idem; 648:Aluminé; 758:Tucumán;
922:Brasil; 930:San Luis; J5:Bahia Blanca;
J55:Cascada de los Alerces (Rio Negro).

Tabla 14. Presencia-ausencia de endofitos en semillas de *Festuca* spp.

	Pob I	Pob II	Pob III	Pob IV
<i>Festuca sp (subulatae)</i>	+ 100% Peru			
<i>Festuca acanthophyla</i>	- 0% 240	- 0% 239		
<i>Festuca ampiflora</i>	+ 100% Corrien	+ 100% Misiones		
<i>Festuca argentina</i>	+ 85% 80	+ 100% 201	+ 100% 648	
<i>Festuca gracillima</i>	- 0% Sta Cruz	- 0% TdelF		
<i>Festuca hieronymi</i>	+ 95% 758	+ 100% 930		
<i>Festuca kurtziana</i>	- 0% 241	- 0% 235		
<i>Festuca magellanica</i> = <i>pyrogea</i>	- 0% 181	- 0% 208	- 0% 153	+ 80% 168
<i>Festuca monticola</i>	- (14) Neuquen			
<i>Festuca pallescens var.pallescens</i>	0% 114	- 0% 154	- 0% 210	- 0% Sta Cruz
<i>Festuca pallescens var.scabra</i>	- 0% 193	- 0 % 206		
<i>Festuca pampeana</i>	- 0% 175	- 0% J5		
<i>Festuca purpurascens</i>	- 0% J 55	- 0% T del F		
<i>Festuca pyrogea var.pyrogea</i> = <i>magellanica</i>	- 0% Filcan	+ 90% 197		
<i>Festuca rubra rubra</i>	- (14) TdF	- 0% 625		
<i>Festuca r. var.simpliciuscula</i>	+ 100% 622	+ 75% Neuquen		
<i>Festuca scabriuscula</i>	- 0% 213	- 0% 221	- 0% Tromen	
<i>Festuca thermarum</i>	- 0% 215			
<i>Festuca tunicata</i>	- 0% 244	- (16) 249	- (10) 246	
<i>Festuca ulochaeta</i>	+ 100% 922			
<i>Festuca ventanicola</i>	- (2) Sa Vent			

% (sobre 20 semillas)

() los números entre paréntesis indican la cantidad de semillas analizadas en esa población

var. simpliciuscula y F. ulochaeta poseen endofitos. En estas especies, excepto F. magellanica, todas las poblaciones estudiadas presentan endofitos, y con frecuencias de 80 a 100 % de las semillas observadas. En el caso de F. magellanica (pyrogea) se analizaron 6 poblaciones, porque en un principio eran consideradas dos especies diferentes, hasta que Dubcovsky, en su trabajo de tesis, las unifica en una sola especie.

De la observación de los endofitos hallados en las semillas, podemos concluir que se trataría del género Acremonium, ya que las hifas se disponen entre las células de la capa de aleurona, semejante a la especie A. coenophialum (lam. XIV, 4), y porque este género se presenta como endofito en otras especies de Festuca (F. arizonica, F. obtusa y F. subulata).

La observación en vaina del endofito de F. argentina, muestra que éste se dispone intercelularmente en el parénquima de forma similar a A. coenophialum. Sin embargo sus hifas son más anchas, y de recorrido menos tortuoso que la especie anterior.

Por la morfología del micelio presente en las semillas, ancho de las hifas, presencia o no de gúttulas, etc., podemos suponer que los endofitos de las Festucas estudiadas serían especies diferentes entre sí y a A. coenophialum (lam. XIV, 1-4). Para confirmar esta

Lámina XIV

Fotos de los endofitos presentes en la capa de
aleurona de las siguientes semillas:

- 1) Festuca argentina (750x)
- 2) Festuca ampiflora (750x)
- 3) Festuca hieronymi (750X)
- 4) Festuca arundinacea (750X), endofito *A.coenophialum*

Lámina XIV



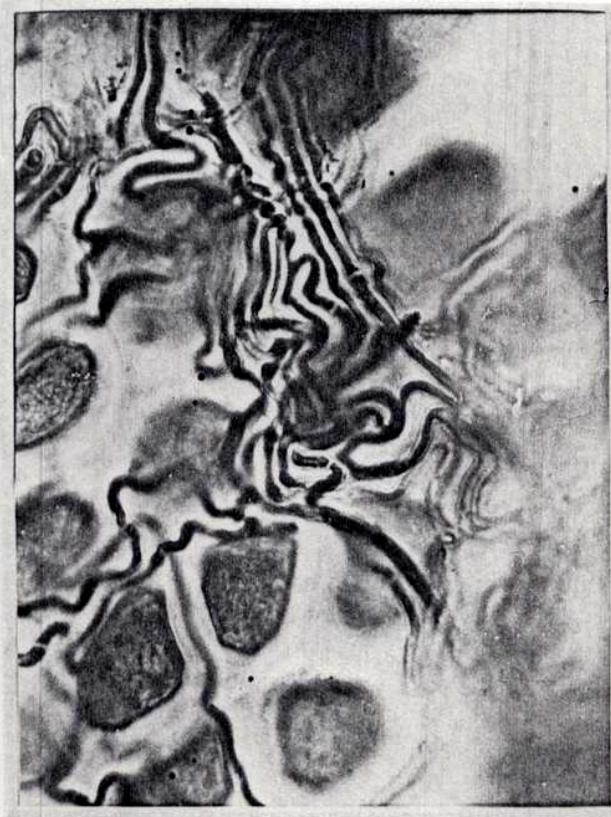
1



2



3



4

suposición se requiere contar con los micelios y realizar el estudio taxonómico de los mismos.

En cuanto al aislamiento de los endofitos, los intentos para obtenerlos, han resultado hasta el momento, infructuosos.

Discusión

1) Toxicidad para los herbívoros-presencia de endofitos

En las especies E.argentina y E.hieronymi, hay datos sobre su toxicidad hacia los herbívoros. Por ej. E.argentina "coirón del huecú" es considerada tóxica para las ovejas, en todas las épocas del año (Parodi, 1950).

Con respecto a E.hieronymi, causante de la "tembladera", existe un trabajo de Rivas y Zanolli (1909) donde intentan extraer el principio tóxico, pero sin resultados. Parodi (1950) comenta de casos de E.hieronymi que aparecen rozadas por los herbívoros, y se pregunta con respecto a esta especie: "contiene alguna substancia, o algún parásito, en ciertos lugares, y no los posee en otros?". Podría estar refiriéndose a los endofitos que se presentarían en algunas poblaciones (tóxicas) y que no existen en otras (inocuas). Sin embargo, en nuestras observaciones sobre esta especie, las dos poblaciones

analizadas presentan endofitos. Es probable que sea necesario estudiar más poblaciones para comprobar si la observación realizada por Parodi, se puede relacionar con la presencia o ausencia de endofitos.

Sobre las restantes especies no hay datos sobre su toxicidad. En algunos casos, como en F. ampiflora y F. ulochaeta, el crecimiento de las plantas en matas dispersas y en lugares poco accesibles para el ganado, hace difícil conocer la existencia de toxicidad para los herbívoros.

La ausencia de endofitos en las especies F. pallescens y F. rubra, coincide con los datos sobre estas especies como buenas forrajeras. En el caso de F. rubra se la cultiva como forrajera invierno-primaveral, sola o para mejorar otras pasturas (Conea, 1978). En las colecciones de esta especie de Estados Unidos, White y Cole (1985) no encuentran endofitos, pero Saha et al. (1987) comprueban la presencia de endofitos en las colecciones de Europa. En este último caso, no hay datos sobre la toxicidad de la planta.

De los resultados obtenidos podemos inferir que cuando la planta presenta toxicidad para el ganado, como F. argentina y F. hieronymi, esto coincide con la existencia de endofitos en las mismas. Por el contrario, la relación inversa no parece cumplirse, es decir, presencia de endofitos-toxicidad de la planta. Por ej. en F. rubra var. simpliciuscula existen endofitos, y la planta parece ser

comida por algún tipo de herbívoros (Dubcovsky, obs.pers.). Aunque en este último caso, no debemos descartar, que la planta infectada con el endofito presente sustancias tóxicas, y por lo tanto resistencia a los insectos herbívoros, y sea inocua para el ganado u otros mamíferos herbívoros. En este sentido, señalamos que en Lolium perenne, existen dos tipos de sustancias, los lolitremos responsables de la toxicidad para los mamíferos, y las peraminas, directamente relacionadas con la resistencia a los insectos herbívoros.

2) Relaciones entre la taxonomía y presencia de endofitos (en colaboración con Jorge Dubcovsky).

La presencia o ausencia de endofitos en Festuca presenta algunas correlaciones con la taxonomía de las especies sudamericanas del género. Dichas correlaciones deben ser tomadas como preliminares por dos razones:

a- No se han determinado aún los endofitos presentes en varias de las especies

b-No existe aún una monografía general de las especies sudamericanas de Festuca. Además, la mayoría de las monografías sudamericanas del género no realizan ningún tipo de agrupación supraespecífica. Constituyen una excepción los trabajos de Alexeev (1984,1986) que si bien tratan sólo algunas de las especies sudamericanas brindan una idea de los diferentes subgéneros que habitan el subcontinente y de

las relaciones de estas especies con las Festucas del resto del mundo.

Siguiendo el criterio de este último autor, las especies estudiadas podrían asignarse a 4 subgéneros diferentes:

- 1) Subgénero Drymanthele: F.purpurascens
- 2) Subgénero Subulatae: F.spl y F.ulochaeta
- 3) Subgénero Mallopetalon: F.ampiflora y F.argentina
- 4) Subgénero Festuca: todas las especies restantes

La única especie estudiada del subgénero Drymanthele no mostró endofitos.

Las dos especies estudiadas del subgénero Subulatae presentaron 100% de endofitos en las semillas analizadas, pertenecientes a una única población de cada especie. Esto concuerda con el registro de endofitos en F.subulata de Estados Unidos (White y Cole, 1985) perteneciente al mismo subgénero.

Un resultado similar se encontró en las dos especies del subgénero Mallopetalon que mostraron presencia de endofitos en las dos poblaciones de F.ampiflora (100%) y en las cuatro poblaciones de F.argentina (85-100%).

Las especies del subgénero Festuca constituyen un grupo heterogéneo de especies. La mayoría de las especies patagónicas estudiadas pertenecen a un grupo muy afin morfológica (Dubcovsky y Martínez 1988 a) y cromosómicamente (Dubcovsky, tesis). Este grupo está constituido por F.acanthophylla, F.gracillima, F.kurtziana, F.monticola, F.pallescens, F.pallescens var. scabra, F.scabriuscula, F.thermarum y F.tunicata. En ninguna de estas especies pudo detectarse presencia de endofitos.

Tampoco se observaron endofitos en F.pampeana, una especie de Sierra de la Ventana, poco relacionada morfológica y cromosómicamente a las restantes especies patagónicas (Dubcovsky y Martínez, 1988 b).

F.hieronymi constituye otro caso en el que resulta difícil encontrar alguna afinidad con las restantes especies estudiadas. En la misma se encontraron endofitos en las dos poblaciones analizadas.

Las dos especies restantes, F.simpliciuscula y F.magellanica pertenecen a un grupo con caracteres morfológicos similares (Dubcovsky y Martínez, 1988 a). En ambas se encontraron endofitos aunque con distinta frecuencia. La primera de ellas, F.simpliciuscula, era considerada como variedad de F.rubra hasta que Alexeev (1984) le asignó rango específico. Las dos poblaciones de F.simpliciuscula mostraron presencia de endofitos. Por el

contrario dos poblaciones analizadas de E. rubra introducidas no mostraron endofitos.

E. magellanica presenta endofitos sólo en dos de las seis poblaciones analizadas, constituyendo la única especie que mostró heterogeneidad en cuanto a la presencia o ausencia de endofitos entre las poblaciones. Esta heterogeneidad se corresponde con una gran variabilidad morfológica entre las poblaciones y con diferencias en el número y morfología de los cromosomas, lo que sugiere que el nombre E. magellanica designa a más de una especie, a un complejo poliploide muy variable y poco estudiado (Dubcovsky, tesis).

Esta concordancia entre grupos taxonómicos y presencia-ausencia de endofitos, nos sugiere que el análisis de la existencia de estos organismos en material vegetal, puede constituir un elemento importante en la clasificación de los grupos vegetales.

CONCLUSIONES

Desde que se inició el estudio de los endofitos fúngicos, las investigaciones se han dirigido a recabar nuevos datos de su existencia, y fundamentalmente, a entender cuál es su papel en relación con las plantas.

En este trabajo estudiamos la estructura y función de la comunidad endofítica, desde varios puntos :

1) estructura de la comunidad.

La comunidad de endofitos está organizada en comunidades-unidades, estructural y funcionalmente integradas, resultado de la interacción de las especies en la escala de la comunidad-unidad. En este hospedante, el tipo de transmisión endofítica es lateral, y por lo tanto, el tipo de mutualismo, inducible.

2) colonización por endofitos-ciclo de vida del hospedante.

Los hospedantes perennes están estrechamente asociados con endofitos, cuyas frecuencias de infección y características de colonización indican un comportamiento como simbioses mutualistas.

3) El antagonismo que se observa entre endofitos y organismos del filoplano, son indicio de su posible intervención en la resistencia a los patógenos fúngicos, y

esto los ubica como organismos importantes en el control biológico natural para ciertas enfermedades fúngicas.

4) Resistencia a los herbívoros

La presencia de endofitos y la relación hallada con la toxicidad de las plantas (Eestuca) y la comprobación de que esa toxicidad está mediada por sustancias producidas por los endofitos (tricotecenos en H.corridifolia) nos señala su importancia en la resistencia del hospedante a los herbívoros.

El conjunto de estas observaciones nos sugiere que los endofitos se comportan como simbioses mutualistas, beneficiando al hospedante en su competencia frente a las plagas y patógenos, y favoreciendo una mayor adaptabilidad del mismo respecto al ambiente.

Este es el primer trabajo integral realizado en el país sobre los endofitos fúngicos, y es parte de una nueva línea de investigación, que se continúa actualmente.

Como resultado de la tesis, se ha hallado una nueva especie fúngica, endofítica en H.corridifolia, y un nuevo registro mundial, junto con Phomopsis sp., de hongos productores de tricotecenos macrocíclicos.

Como quedó expresado en el cap.V, parte II, el estudio de los endofitos fúngicos constituye un nuevo elemento a tener en cuenta tanto en la taxonomía de las plantas como en los trabajos ecológicos, ya que la adaptabilidad de las plantas al ambiente está relacionada a la presencia-ausencia de estos organismos .

BIBLIOGRAFIA

- AIST, J.R.(1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Ann.Rev.Phytopathol.*14:145-163.
- ALEXEEV, E.B.(1984). On the taxa and typification of some taxa of the genus *Festuca* (Poaceae) from South America. *Bot.J.U.S.S.R.*69(3):346-353.
- ALEXEEV, E.B.(1986). *Festuca* L (Poaceae) in Venezuela, Colombia y Ecuador. *Notitales Systematicae Plantarum Vascularium* 23:5-23.
- ALEXANDER, M.P. (1980). A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain technology* 55(1):13-18.
- ANDREWS, J.H.; E.P. HECHT; y S.BASHIRIAN. (1985). Association between the fungus *Acremonium curvulum* and Eurasian water milfoil, *Myriophyllum spicatum*. *Can.J.Bot.*60:1216-1221.
- ARREGUINE, V.H. (1918). "Contribución al estudio del *Baccharis coridifolia* D.C.", Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Universidad de Buenos Aires), Buenos Aires.
- de BARY, A. (1866). *Morfologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten*. Vol.II. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Leipzig.
- BACON, C.W. (1988). Procedure for isolating the endophyte from tall fescue and screening isolates for ergot alkaloids. *App.Env.microb.*54(11):2615-2618.
- BACON, C.W.; P.C.LYONS; J.K.PORTER y J.D.ROBBINS. (1986). Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agron. J.*78:106-116.

- BACON, C.W., J.K.PORTER y J.D.ROBBINS (1975). Toxicity and occurrence of Balansia on grasses from toxic fescue pastures. Appl. Microbiol. 29:553-556.
- BACON, C.W.; J.K.PORTER ; J.D.ROBBINS y E.S.LUTRELL (1977). Epichloe typhina from toxic tall fescue grasses. Appl.Envirom.Microbiol.34:576-581.
- BACON, C. W. y M.R.SIEGEL (1988). Endophyte Parasitism of tall fescue. J.Prod.Agric.1:45-55.
- BARKER, G.M.; R.P.POTTINGER y P.J.ADDISON (1983). Effect of tall fescue and ryegrass endophytes on Argentine stem weevil. Proc.N.Z.Weed Pest Control Conf. 36:216-219.
- BARRETT, J.A. (1983). Plant-fungus symbiosis. En: Coevolution (D.J.Futuyma y M.Satkin, eds.),pp:137-160 . Sunderland:Sinauer Associates.
- BELESKY, D.P.; O.J.DEVINE; J.E.FALLAS y W.C.STRINGER (1987, b). Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. Photosynthetica, vol.21(1):82-87.
- BELESKY, D.P.; J.D.ROBBINS; J.A.STUEDEMANN; S.R.WILKINSON y O.J.DEVINE (1987, a). Fungal endophyte infection-loline derivate alkaloid concentration of grazed tall fescue. Agron.J.79:217-220.
- BELESKY, D.P.; J.A.STUEDEMANN ; R.D.PLATTNER y S.R.WILKINSON (1988). Ergopeptine alkaloids in grazed tall fescue. Agron.J.80(2):209-212.
- BERSTEIN, M.E. y G.C.CARROLL (1977). Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. Can.J.Bot. 55(6):644-653.
- BERTONI, M.D. y D.CABRAL (1988). Phyllosphere of Eucalyptus yiminalis II:Distribution of endophytes. Nova Hedwigia 46(3-4):491-502.

- BERTONI, M.D. y D.CABRAL . Fungal endophytes in Baccharis coridifolia. I. Ceratopycnidium ___ bacchariicicolum sp.nov. Mycological Research (en prensa).
- BINYAMINI, N. y M.SCHIFFMANN-NADEL (1972). Latent infection in avocado fruit due to Colletotrichum gloeosporioides. Phytopathology, 62:592-594.
- BLAKEMAN, J.P. y N.J.FOKKEMA (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann. Rev.Phytopathol.20:167-192.
- BODDY, L., O.M.GIBBON y M.A.GRUNDY (1985). Ecology of Daldinia concentrica: effect of abiotic variables on mycelial extension and interspecific interactions. Trans.Br.mycol.Soc.85(2):201-211.
- BODDY, L. y A.D.M. RAYNER (1982). Population structure, intermycelial interactions and infection biology of Stereum gausapatum. Trans. Br. mycol. Soc. 78(2):337-351
- BOULLARD, B. (1951). Champignons endophytes de quelques fougères indigènes et observations relatives a Ophioglossum vulgatum L. Botaniste 35:257-280.
- BOULLARD, B.(1957). La mycotrophie chez les Pteridophytes. Sa fréquence, ses caractères, sa signification. Botaniste 41:1-185.
- BRUNDRETT, M.C.; Y.PICHE y R.L.PETERSON (1984). A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Can.J.Bot.62:2128-2134.
- BUCKNER, R.C.; L.P.BUSH y P.B.BURRUS (1973). Variability and heritability of perloline in Festuca sp., Lolium sp. and Lolium-Festuca hybrids. Crop.Sci.13:666-669.
- BURKART, A. (1974). Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina).VI. Dicotiledoneas metaclamideas. Inta, 554 pp.

- BUSAM, L. y G.C.HABERMEHL (1982). Accumulation of mycotoxin by Baccharis coridifolia. A reason for livestock poisoning. *Naturwissenschaften* 69:392-393.
- BUSH, L.P.; J.A.BOLING y S.G.YATES (1979). Animal disorders. In: Tall fescue (R.C.Buckner and L.P.Bush, eds) *Agronomy* 20:247-292.
- BUSH, L.P. y P.B.BURRUS (1988). Tall fescue forage quality and agronomic performance as affected by the endophyte. *J.Prod.Agric.*, 1:56-60.
- CABRAL, D. (1982). Contribucion al estudio de la filosfera de Eucalyptus viminalis. Dinamica de ls poblaciones fungicas. Univ.Buenos Aires.Tesis.
- CABRAL, D. (1985). Phyllosphere of Eucalyptus viminalis: dynamics of fungal populations. *Trans.Br.mycol. Soc.* 85(3):501-511.
- CABRAL, D. y M.D.BERTONI (1984). Condiciones de iluminaci3n y temperatura para la fructificaci3n de Zoellneria eucalypti (Berk.) Denn. (Discomycetes) "in vitro". *Physis* 42(103):121-126.
- CABRAL, D. ; M.D.BERTONI y E.VARSAVSKY. Fungal endophytes in Baccharis coridifolia. II.A possible source of macrocyclic trichothecenes. *Mycological Research* (en prensa).
- CABRAL, D. y G.C.CARROLL. A census of the endophytic mycoflora of Juncus spp.I. (en prensa).
- CABRAL, D. y J.K.STONE . A census of the endophytic mycoflora of Juncus spp.II Microscopic observations of infection patterns (en prensa).
- CARROLL, G.C.. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: *Microbiology of the phyllosphere* (Ed. Fokkema and van den Heuvel) pp:205-222. Cambridge Univ. Press., Cambridge, England.

- CARROLL, G.C.. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- CARROLL, G.C.. y F.E.CARROLL (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can.J.Bot.* 56:3034-3043.
- CARROLL, F.E.; E.MULLER y B.C.SUTTON (1977). Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia* 29:87-103.
- CARROLL, G.C. y D.PETRINI (1983). Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75(1):53-63.
- CHEPLICK, G.P y K.CLAY (1988). Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 52:309-318.
- CLARK, E.M.; J.F.WHITE y R.M.PATTERSON (1983). Improved histochemical techniques for the detection of Acremonium coenophialum in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus. *J. Microbiol. Methods* 1:149-155.
- CLAY, K. (1984). The effect of the fungus Atkinsonella hypoxylon (Clavicipitaceae) on the reproductive system and demography of the grass Danthonia spicata. *New Phytologist* 98:165-175.
- CLAY, K. (1986). Grass endophytes. En: *Microbiology of the Phyllosphere* (N.J.Fokkema and J.van den Heuvel, eds.), pp:188-204 Cambridge Univ. Press, Cambridge, England.
- CLAY, K. (1987). Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of Lolium perenne and Festuca arundinacea. *Oecologia* 73:358-362.
- CLAY, K. (1988). Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69:10-16.

- COOK, F. (1954). The use of antibiotics in media for the isolation of fungi from polluted water. *Antibiotics and Chemotherapy* 4:657-662.
- COOKE, R. (1977). The biology of symbiotic fungi. John Wiley and Sons, London. 282pp.
- COOKE, R.C. y A.D.M.RAYNER (1984). Ecology of saprotrophic fungi. Longman, London, N.Y., 414pp.
- CORREA, M.N.(1978). Flora Patagónica.III.Graminae.Colección Científica del Inta.
- CROMEY, M.G. y L.J.COLE (1984). An association between a Lolium endophyte and Drechslera dictyoides. *Trans.Br.mycol.Soc.* 83:159-161.
- CUBIT, J.D. (1974). Interactions of seasonally changing physical factors and grazing affecting high intertidal communities on a rocky shore. Ph.D. Thesis, Eugene, Univ.of Oregon.
- CULLEN, D. y J.H.ANDREWS (1984). Evidence for the role of antibiosis in the antagonism of Chaetomium globosum to the apple scab pathogen Venturia inaequalis. *Can.J.Bot.* 62:1819-1823.
- CULVER, D.C.(1981). Introduction to the theory of species interactions. En: *The fungal community* (D.T.Wicklowsky y G.C.Carroll, eds.), pp:281-294. New York:Marcel Dekker.
- CUNNINGHAM, I.J.(1949). A note on the cause of tall fescue lameness in cattle. *Aust.Vet.J.* 25:27-28.
- CZEKANOWSKI, J. (1913). En: *An introduction to numerical classification* (H.T. CLIFFORD y W.STENPHENSON , eds.) Academic Press, N.Y.1975.
- DANIEL, W.N.(1978). Applied nonparametric statistics. Houghton Mifflin Company, USA.

- DAVIS, C.B. y B.J.CAMP y J.C.READ.(1983). The vaso-active potential of halostachine, an alkaloid of tall fescue (Festuca arundinacea Scrb.) in cattle. Vet. Hum. Toxicol.25:408-411.
- DICKINSON, C.H. y A.M.SKIDMORE (1976). Interactions between germinating spores of Septoria nodorum and phylloplane fungi. Trans.Br.mycol.Soc.66(1):45-56.
- DIEHL, W. W.(1950). Balanisia and the Balansiae in America. Agriculture Monograph 4. Washington DC: United States Department of Agriculture.
- DIXON, W.J. y F.J.MASSEY (1957). Introducción al análisis estadístico. McGraw Hill.
- DREYFUSS, M. y O.PETRINI (1984). Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. Bot.Helv.94(1):33-39.
- DUBCOVSKY, J. y A.MARTINEZ (1988). Cariotipos y comportamiento meiótico de las especies de Festuca (Poaceae) endémicas de Sierra de la Ventana. Bol.Soc.Arg.Bot.25(3-4):415-423.
- DUBCOVSKY, J. y A.MARTINEZ (1988). Phenetic relationships in the Festuca spp.from Patagonia.Can.J.Bot.66:468-478.
- FAIFFER, G.C. y M.D.BERTONI (1988). Interactions between epiphytes and endophytes from the phyllosphere of Eucalyptus viminalis.III. Nova Hedwigia 47(1-2):219-229.
- FINERAN, B.A.; I.C.HARVEY y M.INGERFELD (1983). Unusual crystalloids and aggregates of tubules in the Lolium endophyte of ryegrass leaf sheaths. Protoplasma 117:17-23.
- FISHER, P.J.; A.E.ANSON y O.PETRINI (1984). Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. Bot.Helvetica 94:249-253.

- FISHER, P.J. y O.PETRINI (1987). Location of fungal endophytes in tissues of Suaeda fruticosa: a preliminary study. Trans. Brit. mycol. Soc. 89:246-249.
- FISHER, P.J.; B.M.SPOONER y O.PETRINI (1987). Pezizella pulvinata var. lignicola var. nov., an endophyte of the xylem of Pinus sylvestris. Trans. Br. mycol. Soc. 89(4):593-596.
- FLETCHER, L.R. y I.C.HARVEY (1981). An association of a Lolium endophyte with ryegrass staggers. N.Z. Vet. J. 29:185-186.
- FLORES, C. y B.A.HOUSSAY (1917). Estudios sobre el mio-mio, nio o romerillo (Baccharis coridifolia D.C.). Revista del Instituto Bacteriologico, Dep. Nac. Hig. 1(1):59-100.
- FOKKEMA, N.J. (1973). The role of saprophytic fungi in antagonism against Drechslera sorokiniana (Helminthosporium sativum) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiol. Plant. Pathol. 3:195-205.
- FOKKEMA, N.J. (1981). Fungal leaf saprophytes, baneficial or detrimental. En: Microbial ecology of the Phylloplane (J.P. Blakeman, ed), pp:432-454. Academic Press, London, NY.
- FUNK, C.R.; P.M.HALISKY y R.H.HURLEY (1983). Implications of endophytic fungi in breeding for insect resistance, pp:67-75. En: Proc. Forage Turfgrass Endophyte Workshop, Oregon State Univ., Corvallis.
- GALLAGHER, R.T; G.S.SMITH; M.E.di MENNA y P.W.YOUNG (1982). Some observations on the neutoxic production in perennial ryegrass. N.Z. vet. J. 30:203-204.
- GAUSE, G.F. (1934). The struggle for existence. Williams & Wilkins, Baltimore. (Reprinted 1971 by Dover, New York).
- GAYNOR, D.L.; D.D.ROWAN; G.C.M.LATCH y S.FILKINGTON (1983). Preliminary results on the biochemical

relationship between adult argentine stem weevil and two endophytes in ryegrass. Proc.N.Z.Weed Pest Control Conf.36:220-224.

- GIBBS, J.N. (1967). A study of epiphytic growth habit of Fomes annosus. Ann.Bot., NS, 31(124):755-773.
- HABERMEHL, G.G. y L. BUSAM (1984). Miotoxin B und C, zwei neue macrocyclische Trichothecene aus Baccharis coridifolia D.C. Justus Liebig's Ann.Chem.1746.
- HABERMEHL, G.G.; L.BUSAM; F.HEYDEL; D.MERS; C.H.TOKARNIA; J.DOBEREINER y M.SFRAUL (1985). Macrocylic trichothecenes: cause of livestock poisoning by the Brazilian plant Baccharis coridifolia. Toxicon 23(5):731-745.
- HARVEY, I.C. (1983). The Lolium endophyte: return from anomymity. Proc.N.Z.Grasslands Assoc.44:234-236.
- HARVEY, I.C. (1985). The Lolium endophyte and ryegrass staggers in New Zealand. In: Trichothecenes and other mycotoxins (J.Lacey,ed.)pp:141-148. John Wiley & Sons Ltd.
- HARRACH, B. (1988). Method for small routine laboratories for the detection of satratoxins in straw samples. Mycotaxon Research, 4:20-24.
- HEALEY, I.N. y M.J.SWIFT (1971). Aspects of the accumulation and decomposition of wood in the litter of a coppiced Beech-Oak woodland. En: IV Colloquium Pedobiologiae, C.R.4eme Coll. Int. Zool. Soc. Ed.INRA, PP 471. Paris.
- HEPPERLY, P.R.; B.L.KIRPATRICK y J.B.SINCLAIR (1985). Abutilon theophrasti: wild host for three fungal parasites of soybean. Phytopathol.70:307-310.
- HERING, T.F. y P.B.NICHOLSON (1964). A clearing technique for the examination of fungi in plant tissue. Nature, 201:942-943.

- HINTON, D.M. y C.W.BACON (1985). The distribution and ultrastructure of the endophyte of toxic tall fescue. *Can.J.Bot.*63:36-42.
- HUDSON, H.J. (1968). The ecology of fungi on plants remains above the soil. *New Phytol.*67:837-874.
- JACKSON, J.A.; R.W.HEMKEN; J.A.BOLING; R.J.HARMON; R.C.BUCKNER y L.P.BUSH (1984). Loline alkaloids in tall fescue hay and seed and their relationship to summer fescue toxicosis in cattle. *Dairy Sci.*67:104-109.
- JARVIS, B.B; J.O.MIDIWO; G.A.BEAN; M.BASSAM ABOUL-NASR y C.S.BARROS . The mystery of trichothecene antibiotics in Baccharis species. *J.Nat.Prod.*(en prensa).
- JARVIS, B.B; J.O.MIDIWO; D.TUTHILL y G.A.BEAN (1981). Interaction between the antibiotic trichothecenes and the higher plant Baccharis megapota mica. *Science* 214:460-462.
- JARVIS, B.B; G.PAVANASASIVAM y G.A.BEAN (1985). Mycotoxin production from Myrothecium species. En: *Trichothecenes and other Mycotoxins* (J.Lacey,ed.) pp:221-231. John Wiley & Sons Ltd.
- JARVIS, B.B; K.M.WELLS; Y.W.LEE; G.A.BEAN; T.KOMMEDAHL; C.S.BARROS y S.S.BARROS (1987). Macrocyclic trichothecene mycotoxins in Brazilian species of Baccharis. *Phytopathology* 77(6):980-984.
- JOHNSON, M.C.; R.L.ANDERSON; R.J.KRYSCID y M.R.SIEGEL (1983). Sampling procedures for determining endophyte content in tall fescue seed lots by ELISA. *Phytopathology* 73:1406-1409.
- JOHNSON, M.C.; M.R.SIEGEL y L.P.BUSH (1985). The endophyte of tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.). En: *Trichothecenes and other mycotoxins* (J.Lacey,ed.). John Wiley and Sons Ltd.
- JONES, T.A.; R.C.BUCKNER; P.B.BURRUS y L.P.BUSH (1983). Accumulation of pyrrolizidine alkaloids in

- benomyl-treated tall fescue parents and their untreated progenies. *Crop.Sci.*23:1135-1140.
- KELLEY, S.E. y K.CLAY (1987). Interspecific competitive interactions and the maintenance of genotypic variation within the populations of two perennial grasses. *Evolution* 41:92-103.
- KING, D.A. y J.E.SCHADE (1984). Alternaria toxins and their importance in food. *Journal of Food protection* 47(11):886-901.
- KULIK, M.M. (1984). Symptomless infection, persistence and production of pycnidia in host and non-host plants by Phomopsis batatae, Phomopsis phaseoli and Phomopsis sojiae, and the taxonomic implications. *Mycologia* 76:274-291.
- KUPCHAM, M.S.; B.B.JARVIS; R.G.DAILEY; W.BRIGHT; R.F.BRYAN y Y.SHIZUNI (1976). Baccharin, a novel potent antileukemic trichothecene triepoxide from Baccharis megapotaica. *J.Am.Chem.Soc.*98(22):7092-7093.
- KUPCHAM, S.M.; D.R.STREELMAN; B.B.JARVIS; R.G.DAILEY y A.T.SNEDEN (1977). Isolation of potent antileukemic trichothecenes from Baccharis megapotaica. *J. Org. Chem.* 42(26):4221-4225.
- LATCH, G.C.M. y M.J.CHRISTENSEN (1985). Artificial infection of grasses with endophytes. *Ann.appl.Biol.*107:17-24.
- LATCH, G.C.M.; M.J.CHRISTENSEN y D.L.GAYNOR (1985). Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 28:129-132.
- LATCH, G.C.M.; L.R.POTTER y B.F.TYLER (1987). Incidence of endophytes in seeds from collections of Lolium y Festuca species. *Ann.appl.Biol.*111:59-64.
- LEUCHTMANN, A. y K.CLAY (1988). Experimental infection of host grasses and sedges with Atkinsonella

- hypoxylon and Balansia__cyperi (Balansiae, Clavicipitaceae). Mycologia 80(3):271-297.
- LEWIS, D.H. (1974). Micro-organisms and plants: The evolution of parasitism and mutualism. 24th Symp. Soc.Gen. Microbiol.pp.367-392. England: Cambridge. Univ. Press.
- LLOYD, A.B. (1959). The endophytic fungus of perennial ryegrass. New Zealand J.Agric.Res.2:1187-1194.
- LUNGBUHL, M. y E.MULLER (1980). Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gleichen Standort wachsenden Pflanzen (Buxus, Hedera, Ilex, Ruscus). Sydowia 33:185-209.
- LUTRELL, E.S.(1974). Parasitism of fungi on vascular plants. Mycologia 66:1-15.
- LYONS, P.C.; R.D.PLATTNER y C.W.BACON (1986). Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. Science 232:487-489.
- MANSFIELD, J.W., N.J.DIX y A.M.FERKINS (1975). Role of the phytoalexin pisatin in controlling saprophytic fungal growth on pea leaves. Trans. Br. mycol. Soc.64(3):507-511.
- MANTLE, P.G. (1969). The role of alkaloids in the poisoning of mammals by sclerotia of Claviceps spp. J.Stored Prod.Res.5:237-244.
- MAUBLANC, M.A. (1907). Ceratopycnidium, genre nouveau de Spheropsidees. Bull.Soc.mycol.Fr.23:146--149.
- McNAUGHTON, S.J. y L.L.WOLFF (1979). General ecology. 2nd ed. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York, 702 pp.
- MELGAREJO, P., R.CARRILLO y E.M.SAGASTA (1985). Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of Monilia laxa. Trans.Br.mycol.Soc. .85(2):313-317.

- MILLER, J.D. (1986). Toxic metabolites of epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. En: Microbiology of the phyllosphere (N.J.Fokkema and J.van den Heuvel, eds.), pp:223-231. Cambridge Univ.Press, Cambridge, England.
- MILLER, W.A. y K.W.ROY (1982). Mycoflora of soybean leaves, pods and seeds in Mississippi. Can.J.Bot.60:2716-2723.
- MINTER, D.W.(1981). Possible biological control of Lophodermium seditiosum. En: Current Research on Conifer Needle Diseases (C.S.Millar, ed.), pp:67-74. Aberdeen:Aberdeen University Press.
- MINTER, D.W.; J.M.STALEY y C.S.MILLAR (1978). Four species of Lophodermium on Pinus sylvestris. Trans. Br. mycol. Soc.71:295-301.
- MORGAN-JONES, G. y W.GAMS (1982). Notes on Hyphomycetes.XLI. An endophyte of Festuca arundinacea and the anamorph of Epichloe typhina, new taxa in one of two new sections of Acremonium. Mycotaxon 15:311-318.
- MORRIS, P.I. y D.J. DICKINSON (1981). Laboratory studies on the antagonistic properties of Scytalidium spp. to basidiomycetes with regard to biological control. IRG-WF 1130:1-16.
- MORTIMER, P.H. (1983). Ryegrass staggers: clinical, pathological and aetiological aspects. Proc.N.Z. Grasslands Assoc.44:230-233.
- MORTIMER, P.H. y M.E. di MENNA (1985). Interactions of Lolium endophyte on pasture production and perennial ryegrass sataggers disease. En: The trichothecene and other mycotoxins (J.Lacey,ed.), pp:149-158. John Wiley & Sons Ltd.
- MUHLE, V.E. y K.FRAUESTEIN (1970). Beobachtungen zum Auftreten des Erstichungsschimmels, Epichloe typhina (Pers.) Tul., an Futtergrasern. Z.Pflanzenkrankh.Pflanzenschutz 77:177-185.

- MURRAY, Ch.(1862). Nota sobre el mio-mio. Revista Farmaceutica 5(3):25-27.
- NATHANIELS, N.Q.R. y G.S.TAYLOR (1983). Latent infection of winter oilseed rape by Leptosphaeria maculans. Plant.Pathol.32:23-31.
- NEAL, W.D. y S.P.SCHMIDT (1985). Effects of feeding Kentucky 31 tall fescue seed infected with Acremonium coenophialum to laboratory rats. J.Anim.Sci.61: 609-611.
- NEILL, J.C. (1941). The endophytes of Lolium and Festuca. New Zealand Journal of Science and Technology.23:185-193.
- O'DONNELL, J. y C.H.DICKINSON (1980). Pathogenicity of Alternaria and Cladosporium isolates on Phaseolus. Trans.Br.mycol.Soc.74(2):335-342.
- ODUM, E.P. (1969). The strategy of ecosystem development. Science 164:262-270.
- ODUM, E.P. (1971). Fundamentals of Ecology. W.B. Saunders. Philadelphia.
- PARKER, A.K. y J.REID (1969). The genus Rhabdocline Syd. Can.J.Bot.47:1533-1545.
- PARODI, L.R.(1950). Las gramíneas tóxicas para el ganado de la República Argentina.Rev.Arg.Agron.17(3):163-229.
- PETERSON, R.L., M.J.HOWARTH y D.P.WHITTIER (1981). Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in Psilotum nudum. Can.J.Bot.59: 711-720.
- PETRINI, O. (1982). Notes on some species of Chloroscypha endophytic in Cupressaceae of Europe and North America, Sydowia 35:206-222.

- PETRINI, O. (1984). Endophytic fungi in British Ericaceae: a preliminary study. *Trans.Br.mycol.Soc.*83(3):510-512.
- PETRINI, O.(1985). Wirtsspezifität endophytischer Pilze bei einheimischen Ericaceae. *Bot.Helv.*95:213-218.
- PETRINI, O.(1986). Taxonomy of endophytic fungi of aerial planta tissues. En: *Microbiology of the phyllosphere* (N.J.Fokkema y J.van den Heuvel, eds.),pp:175-187. Crambridge Univ.Press,Cambridge, England.
- PETRINI, O. y G.C.CARROLL (1981). Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Can.J.Bot.*59(5):629-636.
- PETRINI, O. y M.DREYFUSS (1981). Endophytische Pilze von epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. *Sydowia* 34:135-148.
- PETRINI, O. y P.J.FISHER (1986). Fungal endophytes in Salicornia perennis. *Trans.Br.mycol.Soc.*87(4):647-651.
- PETRINI, O. y E.MULLER (1979). Pilzliche Endophyten, am Beispiel von Juniperus communis L. *Sydowia* 32:223-251.
- PETRINI, O., J.STONE y F.E.CARROLL (1982). Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can.J.Bot.*60(6):789-796.
- PHILLIPS, J.M. y D.S.HAYMAN (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Trans. Br. mycol. Soc.* 55(1):158-161.
- POCOCK, K. Y J.G.DUCKETT (1984). A comparative ultrastructural analysis of the fungal endophytes in Cryptothallus mirabilis Malm. and other british thalloid hepatics. *Journal of bryology*, 13(2):227-233.

- PORTER, C.L.(1924). Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *Am.J.Bot.*11:168-188.
- PORTER, D. (1985). Mycoses of marine organisms: an overview of pathogenic mechanisms. En: Proceedings of the Fourth International Marine Mycology Symposium (S.T.Moss,ed). Cambridge:Cambridge University Press.
- PRESTIDGE, R.A.; R.P.FOTTINGER y G.M.BARKER (1982). An association of Lolium endophyte with ryegrass resistance to Argentine stem weevil. *Proceedings N. Z. Weed Pest Control Conf.*35:199-222.
- PUGH, G.J.F. y N.G.BUCKLEY (1971). The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. En: Ecology of leaf surface microorganisms (T.F.Preece y C.H.Dickinson, eds.),pp:431-445. Academic Press, London, N.Y.
- PURKAYASTHA, R.P. y B.BHATTACHARYYA (1982). Antagonism of micro-organisms from jute phyllosphere towards Colletotrichum corchori. *Trans.Br.mycol.Soc.*78(3): 509-513.
- PRUSKY, D.; N.T.KEEN; J.J.SIMS y S.L.MIDLAND (1982). Possible involvement of an antifungal Diene in the latency of Colletotrichum gloeosporoides on unripe avocado fruits. *Phytopathology* 72(12):1578-1582.
- RAI, B y D.B.SINGH (1980). Antagonistic activity of some leaf surface microfungi against Alternaria brassicae and Drechslera graminea. *Trans.Br.mycol.Soc.*75(3): 363-369.
- RAYNER, A.D.M. y N.K.TODD (1979). Population and community structure and dynamics of fungi in decaying wood. *Advances in Botanical Research* 7:333-420.
- RAYNER, A.D.M. y J.F.WEBBER (1984). Interspecific mycelial interactions-an overview. En: The ecology and physiology of the fungal mycelium (D.H.Jennings y A.D.M.Rayner, eds.),pp:383-417. Cambridge Univ. Press.

- READ, J.C. y B.J.CAMP (1986). The effect of the fungal endophyte Acremonium coenophialum in tall fescue on animal performance toxicity, and stand maintenance. *Agron.J.*78:848-850.
- REDDICK, B.B. (1988). Detection of the tall fescue endophyte with emphasis on enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Production Agriculture* 1(2):133-136.
- RIESEN, T. (1985). Endophytic fungi in winter wheat (Triticum aestivum L.). Part.1. A comparison between four wheat cultivars with different resistance to Phaeosphaeria nodorum (Müller) Hedjaroude. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.Thesis.
- RIVAS, H. y C.ZANOLLI (1909). La tembladera. Enfermedad propia de los animales herbivoros de las regiones andinas. Folleto de 29 pág., más 6 lám. La Plata.
- ROBBINS, J.D.; J.G.SWEENEY; S.R.WILKINSON y D.BURDICK (1972). Volatile alkaloids of Kentucky 31 tall fescue seed (Festuca arundinacea Schreb.). *J.Agric.Food Chem.*20:1040-1042.
- ROWAN, D.D; M.B.HUNT y D.L.GAYNOR (1986). Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte Acremonium loliae. *Journal of the Chemical Society D Chemical Communications* 142:935-936.
- RYKARD, D.M.; C.W.BACON y E.S.LUTRELL (1985). Host relations of Myriogenospora atramentosa adn Balansia epichloe (Clavicipitaceae). *Phytopathology* 75:950-956.
- SAHA, D.C.; J.M.JOHNSON-CICALESE; P.M.HALISKY; M.I.VAN HEEMSTRA y C.R.FUNK (1987). Occurrence and significance of endophytic fungi in the fine fescues. *Plant disease* 71(11):1021-1024.
- SAMPSON, K. (1933). The systemic infection of grasses by Epichloe typhina (Pers.) Tul. *Trans.Br.mycol.Soc.* 18:30-47.

- SAMPSON, K. (1935). The presence and absence of an endophytic fungi in Lolium temulentum and L.perenne. Trans.Br.mycol.Soc.19:337-343.
- SCHULZ, F.A. (1978). Some physiological and biochemical aspects of the action mechanisms of fungal parasites during fruit storage. Fruits 33:15-21.
- SCHUSTER, R.M. (1966). The Hepaticae and Anthocerotae of North America. vol.I.Columbia Univ.Press, New York.
- SHEARER, C.A. y L.C. LANE (1983). Comparison of three techniques for the study of aquatic Hyphomycetes communities. Mycologia 75:498-508.
- SIEGEL, M.R., G.C.M.LATCH y M.C.JOHNSON (1985). Acremonium fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: significance and control. Plant Disease 69(2):179-183.
- SIEGEL, M.R.; G.C.M.LATCH y M.C.JOHNSON (1987,b). Fungal endophytes of grasses. Ann.Rev.Phytophalol.25:293-315.
- SIEGEL, M.R.; U.JARLFORS; G.C.M.LATCH y M.C.JOHNSON (1987,a). Ultrastructure of Acremonium coenophialum, Acremonium lolii and Epichloe typhina endophytes in host and nonhost Festuca and Lolium species of grasses. Can.J.Bot.65:2357-2367.
- SIEGEL, M.R.; M.C.JOHNSON; D.R.VARNEY; W.C.NESMITH; R.C. BUCKNER; L.P.BUSH; P.B.BURRUS; T.A.JONES y J.A.BOLING (1984). A fungal endophyte in tall fescue: incidence and dissemination. Phytopathology, vol.74(8):932-937.
- SKIDMORE, A.M. y C.H.DICKINSON (1976). Colony interactions and hyphal interference between Septoria nodorum and phylloplane fungi. Trans.Br.mycol.Soc.66(1): 57-64.
- SMITH, G. (1900). The haustoria of the Erysipheae. Bot.Gaz.29:153-184.

- SMITH, K.T.; C.W.BACON y E.S.LUTRELL (1985). Reciprocal translocation of carbohydrates between host and fungus in bahiagrass infected with Myriogonospora atramentosa. Phytopathology 75:407-411.
- SOKAL, R. y P.A.SNEATH (1963). Principles of Numerical Taxonomy. W.H.Freeman and Co., San Francisco, 338pp.
- STONE, J. (1986). Foliar endophytes of Douglas fir. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. Ph.D.dissertation, Univ.of Oregon, Eugene, Oregon. U.S.A.
- STONE, J. (1987). Initiation and development of latent infections by Rhizoctonia parkeri on Douglas-fir. Can.J.Bot.65:2614-2621.
- STRAHAN, S.R.; R.W.HEMKEN; J.A.JACKSON; R.C.BUCKNER; L.P.BUSH y M.R.SIEGEL (1987). Performance of lactating dairy cows fed tall fescue forage. J.Dairy Sci.70:1228-1234.
- SUTTON, B.C.(1980). The coelomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- SWIFT, M.J. (1976). Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats. In: The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition process (J.M.ANDERSEN y A.MACFAYDEN, eds.). Blackwell Sci.Pub., Oxford, 474 pp.
- TODD, D. D.(1984). A field study of the endophytic fungi in Douglas fir needles. Univ.of Oregon. Thesis.
- TOKUNAGA, Y. y I.OHIRA (1973). Latent infection of anthracnose on Citrus in Japan. Rept.Tottori. Mycol. Inst.10:693-702.
- UENO, Y. (1983). Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects (Y.Ueno, ed.). Kodansha Scientific Press, Tokyo, 313 pp.

- VENEDIKIAN, N. (1984). Analisis de la micoflora en hoja viva de Pinus taeda. Physis 42(102):7-16.
- VERHOEFF, K. (1974). Latent infections by fungi. Ann.Rev.Phytopathol.12:99-110.
- WEBBER, J. (1981) A natural biological control of Dutch elm disease. Nature, Lond.292:449-451.
- WEBBER, J. y J.N.GIBBS (1984). Colonization of elm bark by Phomopsis oblonga. Trans.Br.mycol.Soc.82:348-352.
- WEBBER, J.F. y J.N.HEDGER (1986). Comparison of interactions between Ceratocystis ulmi and elm bark saprobes in vitro and in vivo. Trans.Br.mycol.Soc.86(1):93-101.
- WESTERN, J.H. y J.J.CAVETT (1959). The choke disease of cocksfoot (Dactylis glomerata) caused by Epichloe typhina (Fr.) Tul. Trans.br.mycol.Soc.42:298-307.
- WHITE, J.F. (1988). Endophyte-host associations in forage grasses.XI. A proposal concerning origin and evolution. Mycologia 80(4):442-446.
- WHITE, J.F. y G.T.COLE (1985). Endophyte-host associations in forage grasses.I.Distribution of fungal endophytes in some species of Lolium and Festuca. Mycologia 77(2):323-327.
- WHITE, J. y G.T.COLE (1985). Endophyte-host associations in forage grasses.III. In vitro inhibition of fungi by Acremonium coenophialum. Mycologia 77(3):487-489.
- WHITE, J.F. y G.T.COLE (1986). Endophyte-host associations in forage grasses. IV.The endophyte of Festuca versuta. Mycologia 78(1):102-107.
- WHITE, J.F. y G.T. COLE (1986). Endophyte-host associations in forage grasses.V. Ocurrence of fungal endophytes in certain species of Bromus and Poa. Mycologia 78(5):846-850.

- WHITE, J.F. y G.T.COLE (1987). Endophyte-host associations in forage grass.X.Cultural studies on some species of Acromonium sect.albo-lanosa, including a new species, A.starri. Mycotaxon 30:87-95.
- WHITE, J.F. y G.MORGAN-JONES (1987). Endophyte-host associations in forage grasses. VII. Acromonium chisosum, a new species isolated from Stipa eminens in Texas. Mycotaxon 28(1):179-189.
- WIDLER, B. y E.MULLER (1984). Untersuchungen uber endophytische Pilze von Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. (Ericaceae). Botanica Helvetica 94(2):307-337.
- WILSON, D.S. (1983). The group selection controversy: history and current status. Annual Review of Ecology and Systematics 14:1559-187
- YATES, S.G.; R.D.PLATTNER y G.B.GARNER (1985). Detection of ergopeptine alkaloids in endophyte infected, toxic Ky-31 tall fescue by mass spectrometry. J.Agric.Food.Chem.3:719-722.