

Tesis Doctoral

Biodeterioro fúngico de madera en el arbolado urbano : prospección, histopatología y control biológico en plátanos (*Platanus acerifolia*)

Robles, Carolina Analía

2014-03-26

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

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

Cita tipo APA:

Robles, Carolina Analía. (2014-03-26). Biodeterioro fúngico de madera en el arbolado urbano : prospección, histopatología y control biológico en plátanos (*Platanus acerifolia*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Robles, Carolina Analía. "Biodeterioro fúngico de madera en el arbolado urbano : prospección, histopatología y control biológico en plátanos (*Platanus acerifolia*)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Biodeterioro fúngico de madera en el arbolado urbano:
prospección, histopatología y control biológico en plátanos
(*Platanus acerifolia*)**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: **Ciencias Biológicas**

Carolina Analía Robles

Director de tesis:	Dra. Silvia Edith Lopez
Director Asistente:	Dra. Cecilia Cristina Carmarán
Consejero de estudios:	Dra. Silvia Edith Lopez

Lugar de trabajo: PROPLAME-PRHIDEB CONICET. Laboratorio de Micología.

Buenos Aires, 2014

Biodeterioro fúngico de madera en el arbolado urbano: prospección, histopatología y control biológico en plátanos (*Platanus acerifolia*)

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar el biodeterioro de madera de *Platanus acerifolia* de la Ciudad de Buenos Aires, en relación con los agentes etiológicos, los endófitos fúngicos y las variables ambientales. Se muestrearon árboles asintomáticos y sintomáticos en 4 sitios de muestreo. Se obtuvieron 27 especies de endófitos, 5 correspondientes a basidiomicetes. Tres especies de basidiomicetes fueron obtenidas de árboles sintomáticos. Las identificaciones fueron realizadas por métodos morfológicos y moleculares. *Phanerochaete chrysosporium* y *Nodulisporium* (Xylariales) presentaron los mayores valores de degradación *in vitro* y de producción de oxidasas. Los análisis multivariados sugieren que la biodiversidad de endófitos está altamente influenciada por el disturbio antrópico. Se encontró una asociación positiva entre la edad de los árboles y la riqueza de endófitos y entre la presencia de basidiomicetes endofíticos y patógenos en cada sitio. La confrontación en cultivos duales entre xilófagos y micromicetes, indican que *Trichoderma harzianum* y el endofito *Granulobasidium vellereum* presentan la mayor capacidad antagonista. Las observaciones en microscopia óptica y electrónica de los patrones de deterioro indican que *Bjerkandera adusta* e *Inonotus rickii* causan una pudrición blanca. *B. adusta* degrada más extensamente que *I. rickii*, con un patrón de degradación simultánea. *I. rickii* produjo un patrón de delignificación selectiva. Los resultados indican que existen hongos colonizando madera sana que poseen el potencial de degradarla, apoyando la hipótesis de la “infección latente”.

Palabras claves: árboles urbanos; basidiomicetes; hongos xilófagos; endófitos fúngicos; *Platanus acerifolia*; pudrición blanca; patógenos latentes; control biológico

Fungal decay of wood in urban trees: survey, histopathology and biological control in plane trees (*Platanus acerifolia*)

Abstract

The aim of this study was to characterize the wood biodeterioration of *Platanus acerifolia* of Buenos Aires City, related to the causal agents, the fungal endophytes and the environmental variables. Asymptomatic and symptomatic trees were sampled in 4 sites of the city. A total of 27 endophytic taxa were obtained, 5 of them corresponding to Basidiomycetes. Three species of Basidiomycetes were obtained from symptomatic trees. Morphological and molecular identifications were performed. *Phanerochaete chrysosporium* and *Nodulisporium* (Xylariales) produced the highest degradation levels and oxidases production *in vitro*. Multivariate analyses suggest that the endophytes biodiversity is highly influenced by the level of anthropogenic disturbance. A positive relationship was found between tree age and endophyte richness and between the presence of endophytic and pathogenic Basidiomycetes in a same site. Confrontation assays in dual cultures between wood decay fungi and micromycetes, indicate that *Trichoderma harzianum* and the endophyte *Granulobasidium vellereum* showed the greatest antagonistic capacity. Analyses under optic and electronic microscopy indicate that *Bjerkandera adusta* and *Inonotus rickii* caused a white-rot pattern in London plane wood. *B. adusta* caused more biodeterioration than *I. rickii* and a simultaneous decay of wood. *I. rickii*, on the other hand, produced a selective delignification on wood. The results indicate that there are fungi colonizing healthy wood that have the capacity to cause wood rotting. This results support the “latent infection” hypothesis.

Keywords: urban trees; Basidiomycetes; xylophagous fungi; fungal endophytes; *Platanus acerifolia*; White rot; latent pathogens; biological control

“Comprender las cosas que nos rodean es la mejor preparación para comprender las cosas que hay más allá”.

Hypatía de Alejandría

“Una sociedad crece bien cuando las personas plantan árboles cuya sombra saben que nunca disfrutarán”.

Proverbio griego

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis directoras Dra. Silvia Lopez y Dra. Cecilia Carmarán, por haber dirigido mi formación científica, por su dedicación y la confianza que depositaron en mí.
- ❖ Al CONICET por las becas otorgadas para la realización de este Doctorado.
- ❖ Al Instituto PROPLAME-PRHIDEB por haberme brindado el espacio y los recursos para la realización de esta tesis.
- ❖ A Pato y Leo, por toda su ayuda en la parte molecular.
- ❖ A Susi Pereira por su ayuda en la identificación de los *Aspergillus* y los análisis multivariados.
- ❖ A Lili, por acompañarme en los muestreos.
- ❖ A la Dra. Andrea Romero, por su ayuda con la nomenclatura de las especies.
- ❖ A la Dra. Marilin Castro, por ayudarme y guiarme en las técnicas histológicas.
- ❖ A Fer, Esteban, Leo, Pato, Vicky Novas, Vicky Vignale, Ale, Mariana, Agus, Laura y Silvia Castellani por la buena onda y el compartir del día a día.
- ❖ A las chicas del laboratorio 70, mis amigas Su, Susi, Lili y Silvi, quienes me acompañan desde el primer día.
- ❖ A Esteban, por su ayuda, consejos y apoyo. Por toda su paciencia.
- ❖ A mis padres, a mi hermana, mi familia y amigos, por su continuo apoyo y confianza.

Índice

Página

Introducción

1.	El arbolado urbano	1
2.	El hospedante: <i>Platanus acerifolia</i>	4
3.	La madera	5
3.1.	La pared celular	6
4.	Degradación de la madera por hongos xilófagos	8
4.1.	Mecanismos de degradación	10
5.	Los endofitos	13
5.1.	Clases de endófitos	13
5.2.	Rol de los de madera	14
5.3.	Estudios en Argentina sobre endofitos	15
5.4.	Basidiomicetes endofíticos	15
6.	Métodos de identificación	16
6.1.	Estudio de caracteres vegetativos	16
6.2.	Reacción de oxidasas	17
6.3.	Estudio de caracteres moleculares	18
7.	Ensayos de pérdida de peso	20
8.	Control biológico	20

Objetivos generales	23
----------------------------	----

Objetivos específicos	23
------------------------------	----

Hipótesis	24
------------------	----

Materiales & Métodos

1.	Área de muestreo y planificación de muestreos	25
2.	Muestreo de árboles sintomáticos y procesamiento de muestras	29
3.	Muestreo de árboles asintomáticos y procesamiento de muestras	30

4.	Identificación de especies	31
5.	Estimadores ecológicos	32
6.	Análisis multivariado	34
7.	Extracción, amplificación y secuenciación de ADN	34
8.	Análisis filogenéticos	37
8.1.	Métodos de máxima parsimonia bajo homologías estáticas	37
8.2.	Inferencia bayesiana bajo homologías estáticas	38
8.3.	Análisis bajo homologías dinámicas	38
9.	Estudios de producción de oxidasas	47
10.	Ensayos de degradación <i>in vitro</i>	47
11.	Control biológico	48
11.1.	Ensayos de confrontación en cultivos duales	48
11.2.	Ensayos de confrontación <i>in vitro</i> sobre probetas de madera de plátano	50
12.	Análisis estadístico	51
13.	Estudios histológicos	52
13.1.	Microscopía óptica	52
13.2.	Microscopía electrónica	53
13.2.1.	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	53
13.2.2.	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i>	53

Resultados

1.	Muestreos	55
1.1.	Composición de la comunidad de endofitos	55
1.1.1.	<i>Diversidad alfa y beta de endofitos</i>	60
1.2.	Análisis de los basidiomicetes totales de árboles sintomáticos y asintomáticos	66
1.3.	Resultados de Análisis Canónico de Correspondencias	69
1.4.	Análisis espacial de la diversidad registrada	71
1.5.	Recuperación de aislamientos en diferentes medios de cultivo	72
2.	Descripciones y consideraciones sobre las especies encontradas	75
2.1.	Ascomicetes endofíticos	75

2.2.	Especies de basidiomicetes: endofitos y patógenos	97
3.	Resultados moleculares y filogenéticos	114
3.1.	Análisis de similitud por BLAST	114
3.2.	Resultados filogenéticos	115
4.	Registro de presencia de oxidasas extracelulares	144
5.	Ensayos de degradación <i>in vitro</i>	153
6.	Control biológico	156
6.1.	Ensayos de confrontación en cultivos duales	156
6.2.	Ensayos de confrontación <i>in vitro</i> sobre probetas de madera de plátano entre <i>Granulobasidium vellereum</i> y hongos xilófagos	176
6.2.1.	Probetas inoculadas previamente con el antagonista	177
6.2.2.	Probetas inoculadas previamente con los xilófagos	178
7.	Estudios histológicos	182
7.1.	Microscopía óptica	183
7.2.	Microscopia electrónica	184
7.2.1.	Microscopia electrónica de barrido	184
7.2.2.	Microscopía electrónica de transmisión	184

Discusión

1.	Composición de la comunidad de endofitos	196
2.	Análisis integral de basidiomicetes	197
3.	Análisis filogenéticos	198
4.	Relación entre disturbio antrópico, edad de los árboles y diversidad de endofitos	199
5.	Reacciones de oxidasas y estudios de degradación <i>in vitro</i>	201
6.	Control biológico	203
7.	Estudios histológicos	204
8.	Consideraciones finales	207

Conclusiones	209
---------------------	-----

Perspectivas	211
---------------------	-----

Bibliografía	212
---------------------	-----

Anexo

1. Medios de cultivo	236
2. Cultivos de endofitos	239
3. Resultados de Análisis Canónico de Correspondencias a través del programa CANOCO for Windows	241
4. Tablas de estadística	244
5. Indicadores de disturbio antrópico en cada Sitio muestreado	248

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1: Algunas anomalías que pueden observarse en árboles urbanos.	Pág. 3
Figura 2: Aspecto general de <i>Platanus acerifolia</i> y aspecto de sus hojas e inflorescencias. Fuente: http://www.treetree.co.uk	5
Figura 3: Elementos de la pared celular vegetal (Schwarze, 2007).	8
Figura 4: Esquema con las características micromorfológicas de los distintos tipos de degradación fúngica de la madera.	12

Materiales y Métodos

Figura 5: Mapa de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.	26
Figura 6: datos de DAP (diámetro a la altura del pecho) de ejemplares de <i>Platanus acerifolia</i> en función de la edad (en años), medido en años (Linsen <i>et al.</i> 2005).	29
Figura 7: unidad de madera tomada de un árbol asintomático, fragmentos a ser sembrados en cajas de Petri y tubo Falcon.	31
Figura 8: aislamiento a partir de fragmentos de madera de árboles asintomáticos.	31

Resultados

Figura 9: Número de endofitos fúngicos aislados de plátanos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina, en los 4 sitios de muestreo.	58
Figura 10: Distribución de las especies de endofitos (N=27) en sus correspondientes órdenes de ascomicetes y basidiomicetes.	59
Figura 11: Distribución de los aislamientos de endofitos (N=130) en sus correspondientes órdenes de ascomicetes y basidiomicetes.	59
Figura 12: Comportamiento de diferentes estimadores de riqueza en	60

función del número de aislamientos para el Sitio A.

Figura 13: Comportamiento de diferentes estimadores de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio C. 61

Figura 14: Comportamiento de diferentes estimadores de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio D. 61

Figura 15: Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio A. 62

Figura 16: Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio C. 62

Figura 17: Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio D. 63

Figura 18: Curvas de acumulación de especies esperadas de endofitos fúngicos para diferentes sitios de muestreo. 64

Figura 19: Curva de acumulación de especies para el sitio A. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza (95 %). 64

Figura 20: Curva de acumulación de especies para el sitio C. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza (95 %). 65

Figura 21: Curva de acumulación de especies para el sitio D. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza (95 %). 65

Figura 22: Identidad, número de aislamientos y fuente de aislamiento (AS o AA) en cada sitio de muestreo de basidiomicetes obtenidos de madera de *P. acerifolia* en Ciudad de Buenos Aires. 67

Figura 23: Número de árboles inspeccionados (AI) según sus valores de DAP (diámetro a la altura del pecho). 68

Figura 24: Número de árboles sintomáticos muestreados (AS) según sus valores DAP (diámetro a la altura del pecho). 68

Figura 25: Número de árboles colonizados (AC) según sus valores DAP (diámetro a la altura del pecho). 69

Figura 26: Ordenamiento a partir del Análisis Canónico de Correspondencias (ejes 1 y 2) de las especies endofíticas (n=27). 71

Figura 27: Aislamientos de endofitos obtenidos en los diferentes segmentos en que fueron divididas las unidades de madera. 72

Figura 28: Aislamientos de endofitos obtenidos en los diferentes medios de cultivo. 73

Figura 29: Aislamientos de basidiomicetes totales obtenidos en los diferentes medios de cultivos.	73
Figura 30: Número de aislamientos de basidiomicetes patógenos obtenidos en diferentes medios de cultivo.	74
Figura 31: Aislamientos de basidiomicetes endofíticos obtenidos en diferentes medios de cultivo.	74
Figura 32: <i>Alternaria alternata</i> . <i>Arthrinium phaeospermum</i> . <i>Aspergillus niger</i> . <i>Aspergillus reptans</i> . <i>Aspergillus ustus</i> . <i>Bipolaris australiensis</i> .	94
Figura 33: <i>Chaetomium funicola</i> . <i>Chaetomium globosum</i> . <i>Cladosporium cladosporioides</i> . <i>Curvularia lunata</i> . <i>Epicoccum nigrum</i> . <i>Fusarium solani</i> . <i>Gliocladium penicillioides</i> .	95
Figura 34: <i>Nodulisporium</i> sp. <i>Pestalotiopsis guepinii</i> . <i>Phialemonium curvatum</i> . <i>Phoma eupyrena</i> . <i>Phomopsis archeri</i> .	96
Figura 35: <i>Pseudallescheria boydii</i> . <i>Sarocladium strictum</i> . <i>Trichoderma atroviride</i> . <i>Trichoderma harzianum</i> .	97
Figura 36: <i>Coprinellus micaceus</i> .	107
Figura 37: <i>Coprinopsis cinerea</i> .	108
Figura 38: <i>Granulobasidium vellereum</i> .	109
Figura 39: <i>Hymenochaete</i> sp.	110
Figura 40: <i>Inonotus rickii</i> .	111
Figura 41: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .	112
Figura 42: <i>Trichosporon sporotrichoides</i> .	113
Figura 43: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 43 secuencias y 1159 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G.	128
Figura 44: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	129
Figura 45: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> para la región del gen de la β -tubulina a partir de 33 secuencias y 1770 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+I+G.	130

Figura 46: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias del gen de la β -tubulina de especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	131
Figura 47: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Coprinopsis</i> y <i>Coprinellus</i> basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 36 secuencias y 827 caracteres nucleotídicos, según el modelo JC+G.	132
Figura 48: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de <i>Coprinellus</i> y <i>Coprinopsis</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	133
Figura 49: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Campanophyllum</i> , <i>Cheimonophyllum</i> , <i>Chondrostereum</i> , <i>Cyphella</i> , <i>Granulobasidium</i> y <i>Hypochnicium</i> basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 30 secuencias y 2105 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G.	134
Figura 50: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de <i>Campanophyllum</i> , <i>Cheimonophyllum</i> , <i>Chondrostereum</i> , <i>Cyphella</i> , <i>Granulobasidium</i> y <i>Hypochnicium</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	135
Figura 51: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Hymenochaete</i> y <i>Pseudochaete</i> basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 41 secuencias y 1007 caracteres nucleotídicos, según el modelo T3P+G.	136
Figura 52: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de <i>Hymenochaete</i> y <i>Pseudochaete</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	137
Figura 53: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Inocutis</i> e <i>Inonotus</i> basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 57 secuencias y 1106 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2+G.	138
Figura 54: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de <i>Inocutis</i> e <i>Inonotus</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	139
Figura 55: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) para las secuencias de <i>Inonotus rickii</i> obtenidas, para la región del gen de la β -tubulina, a partir de 12 secuencias y 615 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G.	140
Figura 56: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias del gen de la β -tubulina de <i>Inonotus rickii</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámica.	141

Figura 57: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de <i>Phanerochaete</i> basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 43 secuencias y 1080 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G.	142
Figura 58: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de <i>Phanerochaete</i> bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas.	143
Figura 59: <i>Nodulisporium</i> sp. endofítico. BAFCCult 4416. (A) reacción con ácido gálico: +++, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, con crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.	145
Figura 60: <i>Nodulisporium</i> sp. patógeno BAFCCult 4384. (A) reacción con ácido gálico: +++, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: ++, con crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.	146
Figura 61: <i>Coprinopsis cinerea</i> . (A) reacción con ácido gálico: -, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: +++, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.	147
Figura 62: <i>Granulobasidium vellereum</i> . (A) reacción con ácido gálico: -, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, con crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, sin crecimiento.	148
Figura 63: <i>Hymenochaete</i> sp. (A) reacción con ácido gálico: +++, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: +++, con crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: ++, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: +++, con crecimiento.	149
Figura 64: <i>Inonotus rickii</i> endofítico. (A) reacción con ácido gálico: +++, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: +++, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: ++, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: ++, con crecimiento. (E) reacción con tirosina: ++, sin crecimiento.	150
Figura 65: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . (A) reacción con ácido gálico: -, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, con crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.	151
Figura 66: <i>Trichosporon sporotrichoides</i> . (A) reacción con ácido gálico: -, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, con crecimiento. (C)	152

reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.

Figura 67: Aspecto de los tubos al finalizar el ensayo de degradación.	154
Figura 68: Porcentaje de pérdida de peso seco en probetas de <i>P. acerifolia</i> .	155
Figura 69: Aumento del radio de la colonia (cm) de <i>Bjerkandera adusta</i> en presencia de los antagonistas evaluados.	159
Figura 70: Aumento del radio de la colonia (cm) de <i>Ganoderma resinaceum</i> en presencia de los antagonistas evaluados.	161
Figura 71: Aumento del radio de la colonia (cm) de <i>Inonotus rickii</i> en presencia de los antagonistas evaluados.	163
Figura 72: Aumento del radio de la colonia (cm) de <i>Trametes trogii</i> en presencia de los antagonistas evaluados.	165
Figura 73: Cultivos duales entre el xilófago <i>B. adusta</i> y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.	167
Figura 74: Cultivos duales entre el xilófago <i>G. resinaceum</i> y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.	169
Figura 75: Cultivos duales entre el xilófago <i>I. rickii</i> y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.	171
Figura 76: Cultivos duales entre el xilófago <i>T. trogii</i> y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.	173
Figura 77: Cultivos controles de los antagonistas evaluados luego de 1 mes.	175
Figura 78: Interacción entre los micelios de <i>Trametes trogii</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> endofítico en cultivos duales luego de 1 mes de incubación, al inocularse el xilófago en primer lugar.	176
Figura 79: Variación el porcentaje de pérdida de peso seco de madera de plátano cuando el antagonista fue inoculado antes que el xilófago.	179
Figura 80: Variación el porcentaje de pérdida de peso seco de madera de plátano cuando el xilófago fue inoculado antes que el antagonista.	180
Figura 81: Aspecto de los tubos al finalizar el ensayo de confrontación <i>in vitro</i> .	181
Figura 82: Coloración doble Safranina-Fast Green. Cortes transversales.	186

Figura 83: Test de fluoroglucinol- HCl. Cortes transversales.	187
Figura 84: Coloración con rojo de rutenio. Cortes transversales.	188
Figura 85: Micrografías ópticas con luz polarizada. Cortes transversales.	189
Figura 86: Micrografías ópticas en microscopio de epifluorescencia. Cortes transversales.	190
Figura 87: Madera afectada por <i>Bjerkandera adusta</i> .	191
Figura 88: Madera afectada por <i>Inonotus rickii</i> .	192
Figura 89: Degradación de madera de <i>Platanus acerifolia</i> . Cortes transversales coloreados con azul de toluidina. Micrografías ópticas.	193
Figura 90: Degradación de madera de <i>Platanus acerifolia</i> . Micrografías SEM.	194
Figura 91: Degradación de madera de <i>Platanus acerifolia</i> . Micrografías TEM.	195

Anexo

Figura 1': Imágenes de cultivos.	239
Figura 2': Imágenes de cultivos en medio MEA 2%.	240

Índice de Tablas

Materiales y Métodos

	Pág.
Tabla 1: Coordenadas geográficas de las cuadras muestreadas en los Sitios A, B y C. Se consideró la mitad de cada cuadra como indicador de la ubicación geográfica.	27
Tabla 2: Secuencias de especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.	39
Tabla 3: Secuencias de especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> para la región codificante de la β -tubulina. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.	40
Tabla 4: Secuencias de especies de <i>Coprinellus</i> y <i>Coprinopsis</i> para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes. *: Trabajo no publicado.	41
Tabla 5: Secuencias de especies de <i>Campanophyllum</i> , <i>Cheimonophyllum</i> , <i>Chondrostereum</i> , <i>Chyphella</i> , <i>Granulobasidium</i> e <i>Hypocnizium</i> para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes. *: Trabajo no publicado.	42
Tabla 6: Secuencias de especies de <i>Hymenochaete</i> y <i>Pseudochaete</i> para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.	43
Tabla 7: Secuencias de especies de <i>Inocutis</i> e <i>Inonotus</i> para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.	44
Tabla 8: Secuencias de especies de <i>Phanerochaete</i> para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.	46

Resultados

Tabla 9: Número de árboles inspeccionados (AI), árboles sintomáticos muestreados (AS), muestras de madera (MM) de árboles sintomáticos, fragmentos obtenidos a partir de MM (fragmentos de MM), aislamientos a partir de MM, árboles asintomáticos (AA), unidades de madera de	56
---	----

árboles asintomáticos (UM), fragmentos obtenidos a partir de los UM (fragmentos de UM) y aislamientos a partir de UM.

Tabla 10: Listado de especies fúngicas, número de aislamientos en cada Sitio de muestreo y frecuencia relativa (<i>F</i>) de las mismas en madera de plátanos asintomáticos de 4 sitios de muestreos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina.	57
Tabla 11: Riqueza, riqueza estimada e índice de diversidad de endofitos para los Sitios A, C y D.	63
Tabla 12: Índice de similitud de especies de endofitos entre los Sitios A, C y D.	65
Tabla 13: Modelo evolutivo de mejor ajuste para cada matriz evaluada, a partir del análisis con el programa Mega 5.1.	116
Tabla 14: Similitud de secuencias para la región ITS1/ITS2 de cepas endofíticas y patogénicas de <i>Nodulisporium</i> aisladas en este trabajo.	118
Tabla 15: Similitud de secuencias para la región del gen de la β -tubulina de cepas endofíticas y patogénicas de <i>Nodulisporium</i> aisladas en este trabajo.	120
Tabla 16: Similitud de secuencias para la región ITS1/ITS2 de cepas endofíticas y patogénicas de <i>I. rickii</i> aisladas en este trabajo.	125
Tabla 17: Similitud de secuencias para la región del gen de la β -tubulina de cepas endofíticas y patogénicas de <i>I. rickii</i> aisladas en este trabajo.	126
Tabla 18: Producción <i>in vitro</i> de oxidasas por parte de cepas endofíticas y patogénicas aisladas de madera de <i>P. acerifolia</i> .	144
Tabla 19: Porcentajes de pérdida de peso seco. Promedio y desviación estándar (DE) para cada tratamiento.	154
Tabla 20: Resultados de enfrentamientos en cultivos duales entre antagonistas saprofitos y endofitos y basidiomicetes xilófagos (<i>B. adusta</i> y <i>G. resinaceum</i>), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo.	156
Tabla 21: Resultados de enfrentamientos en cultivos duales entre endofitos y basidiomicetes xilófagos (<i>I. rickii</i> y <i>T. trogii</i>), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo.	157
Tabla 22: Inhibición de crecimiento (%) en enfrentamientos en cultivos duales entre antagonistas saprofitos y endofitos y basidiomicetes xilófagos (<i>B. adusta</i> y <i>G. resinaceum</i>), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo.	157

Tabla 23: Inhibición de crecimiento (%) en enfrentamientos en cultivos duales entre antagonistas saprofitos y endófitos y basidiomicetes xilófagos (<i>I. rickii</i> y <i>T. trogii</i>), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo.	158
Tabla 24: Porcentajes de pérdida de peso seco a partir de los ensayos de confrontación <i>in vitro</i> . Promedio y desviación estándar (DE) para cada tratamiento.	177
Tabla 25: Análisis de la varianza de dos factores para el porcentaje de peso seco perdido.	178
Tabla 26: Resultados de los histotests en madera control y madera afectada por <i>B. adusta</i> e <i>I. rickii</i> .	182

Anexo

Tabla 1': Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para los ensayos de degradación <i>in vitro</i> de diferentes especies de basidiomicetes.	244
Tabla 2': Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para los ensayos de control biológico en los cuales se inoculó primero al antagonista.	244
Tabla 3': Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para los ensayos de control biológico en los cuales se inoculó primero al xilófago.	245
Tabla 4': Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para efecto de presencia de antagonista para los ensayos de control biológico.	245
Tabla 5': Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con <i>G. vellereum</i> . <i>B. adusta</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	245
Tabla 6': Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con <i>G. vellereum</i> . <i>G. resinaceum</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	245
Tabla 7': Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con <i>G. vellereum</i> . <i>I. rickii</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	246
Tabla 8': Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con <i>G. vellereum</i> . <i>T. trogii</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	246
Tabla 9': Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con los xilófagos. <i>B. adusta</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	246

Tabla 10’: Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con los xilófagos. <i>G. resinaceum</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	246
Tabla 11’: Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con los xilófagos. <i>I. rickii</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	246
Tabla 12’: Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con los xilófagos. <i>T. trogii</i> con y sin <i>G. vellereum</i> .	247



Introducción

La segunda mitad del siglo XIX estuvo, en términos de las disciplinas biológicas, signada por la teoría de la generación espontánea, vigente en ese momento. Si bien hacía tiempo que se había notado la asociación entre hongos y maderas en descomposición, es en el marco de esta teoría donde se buscaban las respuestas a estas observaciones, describiendo al crecimiento fúngico como un producto del proceso de deterioro de la madera. Los trabajos pioneros de Robert Hartig en 1874 y 1878, llevaron a aceptar que, en la relación entre maderas y hongos, eran estos últimos los responsables de la descomposición de la madera. En sus trabajos de carácter histológico, se asoció la presencia de hifas en la madera con la presencia de basidiomas en la superficie de los árboles en descomposición y se observó que una especie fúngica particular producía un tipo de pudrición similar sobre diferentes especies de árboles. Estos trabajos darían origen a lo que se convertiría en una de las ramas más estudiadas de la Micología y que aportaría, con el devenir de las investigaciones, las bases para un gran cantidad de desarrollos biotecnológicos.

El trabajo que se presenta en esta tesis aspira a brindar nuevos eslabones en el conocimiento acerca de la identidad y el comportamiento de los hongos degradadores de madera y su relación con otras comunidades fúngicas.

1. El arbolado urbano

Aún cuando el arbolado urbano es un elemento incorporado al inconsciente colectivo, por lo general es subestimado y descuidado por el habitante urbano. Los árboles influyen sobre el microclima urbano regulándolo a través de la transpiración, lo cual tiene un efecto refrescante en la atmósfera, alteran la velocidad del viento, por ejemplo: bloqueándolo en invierno, y producen sombra, disminuyendo el calentamiento solar de superficies artificiales y en consecuencia el consumo de energía (Kane, 2005; Nowak & Dwyer, 2007). También contribuyen a reducir la contaminación del aire y absorben gases a través de sus estomas, reduciendo de este modo el nivel de dióxido de carbono (Nowak & Dwyer, 2007). Asimismo sus hojas captan partículas del aire, que son finalmente arrastradas por la lluvia y absorben contaminantes tóxicos, los cuales se incorporan al suelo luego de la caída y descomposición de las mismas (Kane, 2005). Durante su crecimiento los árboles acumulan biomasa ya que absorben carbono y nutrientes, reduciendo el efecto invernadero (Kane, 2005). Entre otros beneficios que brindan es posible mencionar que conforman el hábitat de numerosas especies, junto

con la reducción de la escorrentía de aguas pluviales, disminuyendo en consecuencia el riesgo de inundaciones y erosión (Kane, 2005). Los niveles de ruido son disminuidos por el arbolado urbano, al dispersarse el sonido por medio de las hojas y los tallos. Finalmente, se debe mencionar su importancia como valor cultural, recreativo y estético, con un valor emocional y espiritual (Bolund & Hunhammar, 1999; Nowak & Dwyer, 2007).

En las ciudades se pueden diferenciar tres condiciones para los árboles presentes en ella: árboles de parques, árboles en veredas y aquellos que se encuentran creciendo en los denominados “bosques urbanos”. Estos últimos son paisajes boscosos, presentes en algunos ámbitos urbanos que van desde pequeños parches de vegetación a grandes bosques (Terho, 2009b). Todos ellos pueden mitigar, en mayor o menor medida, muchos de los impactos ambientales producidos por el desarrollo urbano.

Las zonas urbanas son un entorno difícil para los árboles. El sitio de implantación suele presentar condiciones desventajosas para su desarrollo. Los principales factores de estrés a los que se hallan sometidos los árboles son: insuficiente espacio para el crecimiento de las raíces, compactación y baja permeabilidad del suelo, daños en el tronco y raíces causados por el tránsito y trabajos de excavación y construcción de edificios, heridas de poda y una falta general de cuidado (Pauleit *et al.*, 2002; Terho, 2009b) (Fig. 1). Estos factores, solos o combinados, pueden vulnerar la salud del árbol, por ejemplo dañando la corteza, y favorecer la entrada de diversos patógenos, entre los cuales se encuentran los hongos xilófagos (Schubert *et al.*, 2008).

La presencia de síntomas (heridas, canchales, entre otros) o signos de pudrición (basidiomas) por parte de estos agentes fúngicos no significa, sin embargo, la muerte inmediata del árbol. El proceso puede extenderse durante varios años, lo que, junto con la compleja red de interacciones involucradas, dificulta la detección temprana de este ataque (Terho & Hallaksela, 2008). La descomposición de la madera tiene un efecto adverso en su capacidad de resistencia y estabilidad, lo que aumenta la posibilidad de fractura natural de fustes y ramas, con el consiguiente riesgo hacia las personas y propiedades, en especial en áreas densamente pobladas (Schubert *et al.*, 2008; Terho, 2009a, b).

La estimación del estado sanitario de los árboles es un tema ampliamente estudiado. Uno de los métodos más conocidos consiste en la inspección visual del árbol (VTA: Visual Assessment Tree), el cual se enfoca en la detección visual de signos o síntomas que puedan asociarse con anomalías estructurales del ejemplar (Mattheck & Breloer,

1994). A partir de este método se deben tomar en consideración un cierto número de factores biológicos, como la presencia de basidiomas o conidiomas, y la presencia de heridas en fustes y/o ramas, etc.

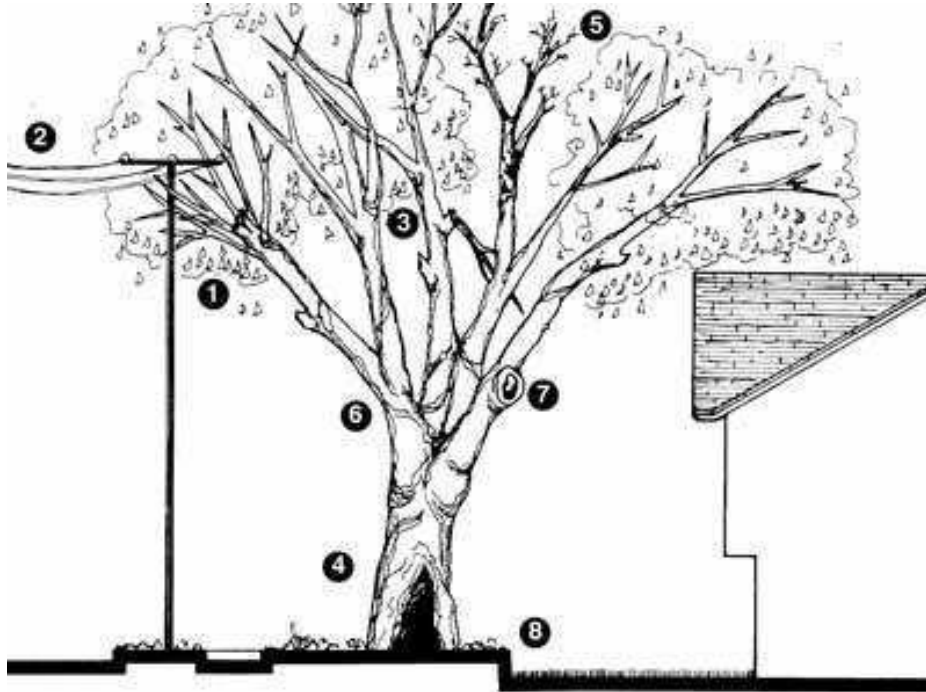


Figura 1: Algunas anomalías que pueden observarse en árboles urbanos. **1:** Signos de poda, ej. por limpieza de líneas eléctricas. **2:** Línea eléctrica adyacente al árbol. **3:** Rama rota o unida parcialmente al resto del árbol. **4:** Cavidad abierta en tronco y/o ramas. **5:** Ramas secas. **6:** Las ramas surgen de un único lugar del tronco. **7:** Heridas con síntoma de degradación. **8:** Cambios en el nivel del suelo, por ejemplo por construcción reciente. Fuente: <http://www.treesaregood.com/>

La Ciudad Autónoma de Buenos Aires es la ciudad más grande y densamente poblada de la República Argentina. Cozzo (1942) fue el primero en mencionar la importancia que revestían los hongos en el arbolado urbano de la Ciudad. Lo siguieron trabajos como los de Wright & Iaconnis (1955) y Zappala *et al.* (1979), entre otros. Sede & Lopez (1999b) realizaron un inventario de basidiomas encontrados en diversas especies de árboles de la Ciudad, registrándose catorce especies de basidiomicetes xilófagos asociados a doce diferentes especies arbóreas. En ese estudio los autores encontraron que las especies de árboles más afectadas fueron el arce (*Acer negundo* L.) y el plátano de sombra (*Platanus acerifolia* (Ait.) Willd). En el censo del arbolado urbano confeccionado por el Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires en el 2001, el plátano se señalaba como la segunda especie arbórea más numerosa (aprox. 15%), detrás del fresno americano (*Fraxinus americana* L.), esta ubicación relativa se ha

mantenido hasta la actualidad, según los datos del nuevo censo realizado en el año 2010 (Buenos Aires frente al cambio climático, 2011).

2. El hospedante: *Platanus acerifolia*

El género *Platanus* (del griego “platys” = ancho, en alusión al tamaño de sus hojas) comprende 10 especies y variedades y es el único representante actual de la familia Platanaceae (Grimm & Denk, 2008), varias de las cuales poseen características que las hacen populares para los ambientes urbanos, como su rápido crecimiento y su gran capacidad de dar sombra debido a sus amplias copas, una atractiva corteza que se separa en capas, buena tolerancia a la poda, resistencia a la contaminación propia de la ciudad y adaptabilidad a un amplio rango de ambientes (Tello *et al.*, 2005). Especies de este género son las más comunes utilizadas en Europa, principalmente en veredas, aunque también en parques y jardines públicos y privados (Pauleit *et al.*, 2002). Los plátanos representan casi un 15% de los árboles urbanos en el sur de Europa, siendo *Platanus acerifolia* el predominante. Estos árboles pueden sufrir diversas patologías como antracnosis, oídio, mildiú pulverulento (powdery mildew), el ataque por *Corythuca ciliata* Say (Insecta, Hemiptera) y de *Ceratocystis platani* (J.M. Walter) Engelbr. & T.C. Harr. (Ascomycota), el cual causa el cancro colorado. Finalmente son susceptibles al ataque de diversos hongos xilófagos (Tello *et al.*, 2005).

Platanus acerifolia, también conocido como *Platanus híbrida* y *Platanus hispanica* (Mill.) Münchh, es un especie cultivada, híbrido entre *Platanus occidentalis* L., nativo del este de Norteamérica y *Platanus orientalis* L., originario del sudeste de Europa y sudoeste de Asia (Fig. 2). Esta especie puede alcanzar alturas de 35 a 40 m en regiones con clima y suelos favorables, y una edad aproximada de 500 años. La madera del plátano es estable, fácilmente impregnable y durable en contacto con el suelo, aunque presenta una tendencia al acanalado y agrietamiento en los extremos (Lahitte *et al.*, 1999). Es favorecido en zonas bajas próximas a los ríos y por suelos sueltos, permeables, frescos y profundos. Como otras especies del mismo género, tolera bajas temperaturas, soporta heladas extremas y sequías aunque se ve afectado por las temperaturas altas extremas. Resiste al ataque de insectos aunque es vulnerable al ataque de ciertos organismos pertenecientes al Reino Stramenopila, como *Phytophthora* spp. (Oomycota) y hongos como *Erysiphe* spp. (Erysiphales, Ascomycota). Se multiplica por medio de estacas de dos años ya que sus semillas tienen bajo poder

germinativo (Leonardis *et al.*, 2000). *Platanus acerifolia* está altamente distribuido en ciudades de Europa, América (Gerhold, 2007), Australia (Smith *et al.*, 2001) y China (Liu *et al.*, 2007). Entre las características que hacen de este árbol un buen candidato para el ambiente urbano se puede mencionar: su resistencia a condiciones climáticas adversas como heladas, altas temperaturas e inundación prolongada, su capacidad de rebrote a partir de yemas adventicias, su rápido crecimiento, alta tolerancia a la poda, aún la severa, y la sombra que produce su copa (Tello *et al.*, 2005).



Figura 2: Aspecto general de *Platanus acerifolia* y aspecto de sus hojas e inflorescencias. Fuente: <http://www.treetree.co.uk>

3. La madera

El sistema vascular de las plantas leñosas está compuesto por el xilema, el cual es el principal tejido conductor de agua, y el floema, el cual es el tejido conductor de nutrientes. Estructuralmente, el xilema es un tejido complejo, con diferentes tipos de células, vivas y muertas. Entre los componentes se encuentran los elementos traqueales (traqueidas o elementos de vasos) que conducen agua y contribuyen al soporte, las células parenquimáticas vivas que brindan funciones de almacenamiento y transporte de nutrientes y las fibras como elementos principales para el soporte del tejido leñoso, y

que en ocasiones pueden retener el protoplasto e involucrar funciones vitales. En este contexto se denomina madera a los elementos que constituyen el xilema secundario en plantas leñosas. El xilema secundario es aquel producido por el cámbium vascular el cual permite el crecimiento en grosor del tronco y está conformado por un sistema axial (vertical) y un sistema radial (horizontal) (Evert, 2006).

A medida que la madera envejece, y ya no actúa como tejido de conducción, sus células parenquimáticas mueren. Previamente, con frecuencia, ocurren cambios visibles en la madera como la pérdida progresiva de sustancias nutritivas almacenadas y la infiltración de ciertas sustancias, como aceites, gomas, resinas y taninos, que la colorean y a veces aromatizan. Esta madera no conductora, en general más oscura, se denomina *duramen*. Si bien no está involucrada en procesos fisiológicos, es el principal soporte mecánico de la planta. La *albura* es la madera conductora, generalmente más clara, la cual posee reservas nutricionales y también contribuye al sostén estructural del tronco (Raven *et al.*, 1992).

3.1 La pared celular

Las paredes de todas las células de la madera se componen de *celulosa*, *hemicelulosas* y *lignina* en diferentes proporciones. La celulosa es el principal componente en las células jóvenes, siendo un polisacárido formado por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces hidroxilo sin ramificar y que conforma una gran estructura cristalina. Dentro de las diferentes capas de la pared celular, la celulosa se dispone como un sistema de fibrillas de 3-4 nm de diámetro, enrolladas helicoidalmente, formando una unidad estructural mayor. Las moléculas de celulosa se encuentran embebidas por *lignina* y *hemicelulosas*. Otros polisacáridos son las pectinas, compuestas por unidades de ácido 1,4-D-galacturonato conectadas entre sí, interrumpidas por unidades 1,2-L-ramnosa. En la laminilla media las sustancias pépticas suelen presentarse como ácido poligalacturónico con iones Ca^+ en la forma de pectato de calcio (Schwarze, 2007). Las ligninas son una clase heterogénea de compuestos, los cuales constituyen polímeros de unidades de fenilpropano. La composición exacta de lignina varía ampliamente según la especie vegetal (Schwarze, 2007). En general, la madera de angiospermas posee un menor contenido de lignina que la de gimnospermas (coníferas), además de diferir en el tipo de monómero de lignina. La lignina de angiospermas se compone de unidades syringyl y guaiacyl, mientras que en

gimnospermas sólo está presente la lignina tipo guaiacyl (Schmidt, 2006). Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosas, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos. A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas no son químicamente homogéneas (Saha, 2003). En angiospermas se encuentra principalmente glucoroxilano y las gimnospermas presentan galactoglucomananos, glucomananos y arabinoglucoronxilano (Schmidt, 2006).

En base a numerosos estudios histológicos, se distinguen 5 capas en la pared celular del xilema: la laminilla media (LM), la pared primaria y una pared secundaria formada por 3 capas, S1, S2 y S3 (Schwarze *et al.*, 2000) (Fig. 3).

La **laminilla media** conecta las células adyacentes en todos los tejidos de la planta. Es en gran medida isotrópica y se observa homogénea bajo microscopio electrónico. Consiste principalmente en sustancias amorfas como la pectina y la lignina (matriz). Debido a su falta de celulosa, no exhibe birrefringencia bajo luz polarizada. La pectina es un polímero con moléculas de ácido galacturónico y grupos carboxilos esterificados parcialmente con metanol y actúa como una sustancia cementante. La laminilla media junto con la pared primaria suele denominarse **laminilla media compuesta** (Schwarze *et al.*, 2000). La laminilla media compuesta le brinda a la pared celular rigidez y resistencia a la compresión debido a la poca proporción de microfibrillas en la matriz y el mayor grado de lignificación asociado.

La **pared primaria** es difícil de distinguir de la laminilla media al microscopio. Se caracteriza por que la celulosa se encuentra en baja proporción (aproximadamente 2,5% del total), y las microfibrillas se disponen dispersas entre sí, mayormente transversas al eje de la célula (Schwarze *et al.*, 2000).

La **pared secundaria** constituye la mayor parte de la pared celular. Se encuentra adyacente a la laminilla media compuesta y llega hasta el lumen celular. En esta pared, la celulosa comprende hasta el 94% de la sustancia. Su principal función es proveer a la célula de resistencia a la tracción. Las capas de la pared secundaria son las siguientes (Schwarze *et al.*, 2000): La **capa S1** – pared secundaria más externa: se encuentra adyacente a la pared primaria y se la suele llamar laminilla de transición. Las microfibrillas de celulosa presentan una débil organización paralela, orientándose aproximadamente transversas al eje longitudinal de la célula. La **capa S2** – pared secundaria central: tiene varios micrómetros de grosor. Es la capa más fuerte de la pared y forma la mayor parte del volumen de la pared celular. Las microfibrillas se ubican paralelas entre sí en una espiral poco profunda (disposición helicoidal paralela) en

dirección al eje longitudinal de la célula. La capa S2 en consecuencia está formada por láminas consecutivas de celulosa, hemicelulosas y lignina dispuestas concéntricamente. Posee un alto contenido de celulosa, cumpliendo un gran papel en la resistencia a la tracción y compresión longitudinal de la madera. La **capa S3** – pared secundaria interna: separa a la célula del lumen. Es relativamente delgada y se considera que está formada por una sola lámina. Las microfibrillas se disponen paralelas o dispersas, semejando la textura de la pared primaria. Posee mucha menor cantidad de celulosa que la capa S2 y en coníferas se encuentra muy lignificada.

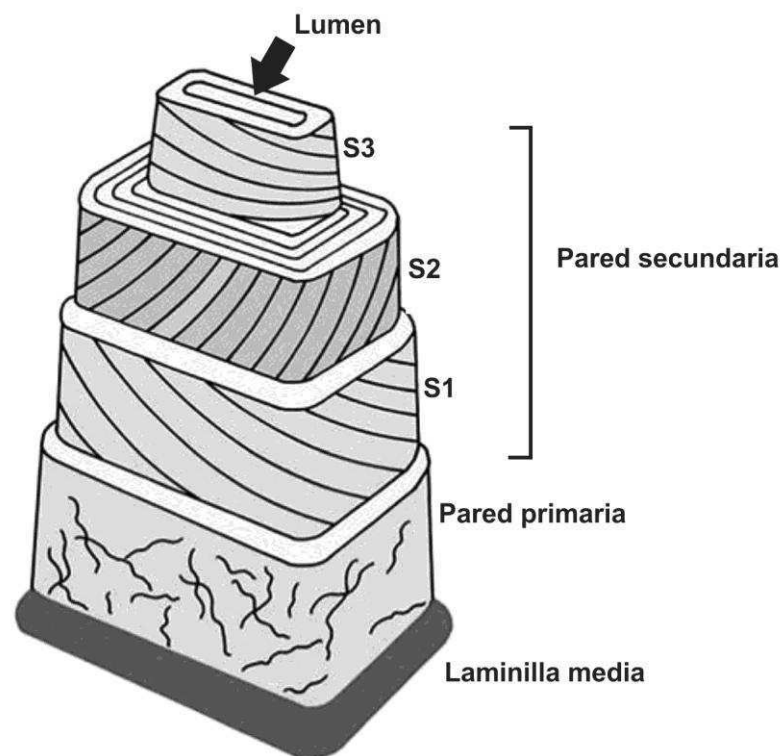


Figura 3: Elementos de la pared celular vegetal (Schwarze, 2007).

4. Degradación de la madera por hongos xilófagos

La madera puede ser degradada por diversos agentes: abióticos, como luz ultravioleta y sustancias ácidas y alcalinas, o bióticos, como insectos, bacterias y hongos.

Los hongos de pudrición tienen un rol trascendental en esta degradación ya que son los únicos organismos que cuentan con las enzimas necesarias para degradar la lignina, un complejo polímero recalcitrante con bajas concentraciones de nitrógeno (Schmidt,

2006). A este grupo de hongos se los suele denominar hongos xilófagos u hongos de duramen haciendo referencia a su capacidad para colonizar el tejido no funcional de la madera. Los árboles afectados por estos hongos se debilitan estructuralmente y pueden ser fácilmente derribados, debido a la disminución de la resistencia y el volumen del xilema, contribuyendo a la degradación natural de la madera (Dai *et al.*, 2007).

Los hongos xilófagos requieren de dos pasos para acceder al interior del árbol: ingresar al interior de la madera, lo que puede implicar atravesar barreras tales como tejidos suberizados, resinas, etc. y, una vez dentro, colonizar nuevos tejidos. El acceso a través de las barreras puede producirse por una penetración directa del micelio a través de discontinuidades naturales de la corteza (por ej. lenticelas) o traumáticas (por ej. heridas por poda). La colonización dentro de la madera se lleva a cabo por los sistemas de tejidos, axial y radial, que por su tamaño ofrezcan menos resistencia a la propagación (Rayner & Boddy, 1988). En el caso de los elementos de vaso o traqueidas lignificadas, estos poseen paredes laterales que conforman una barrera para la colonización transversal, sin embargo, las puntuaciones representan para los xilófagos vías de pasaje entre distintos elementos celulares.

Las paredes relativamente gruesas de las fibras, junto a la menor cantidad de puntuaciones y su lumen angosto, las hace poco efectivas para la colonización axial y transversal. Por el contrario, las células del parénquima, con sus paredes más delgadas y lumen grande y la presencia de nutrientes asimilables derivados de sus protoplastos, facilitan la propagación una vez muertas (Rayner & Boddy, 1988). Particularmente, el parénquima radial puede proveer una ruta directa de colonización a aquellos patógenos que acceden a través de la corteza. En contraposición, en la mayoría de las maderas no existe un sistema tangencial organizado por lo que el avance del patógeno en esta dirección es mucho más lento que en la dirección radial y axial (Rayner & Boddy, 1988).

La invasión de patógenos o el daño mecánico en la albura desencadenan procesos por parte de la planta con el fin de aislar el tejido dañado y evitar que el daño se propague al resto de la planta. Esto se conoce como *compartimentalización*. Las respuestas de la planta pueden ser variadas. En angiospermas suelen producirse tilosas (proliferaciones de la membrana plasmática del parénquima adyacente dentro del lumen de los vasos, a través de las puntuaciones), que pueden ocluir completamente el lumen del vaso o las fibras adyacentes al parénquima. Las tilosas son características del

duramen. También pueden producirse compuestos tóxicos que limitan el crecimiento hifal, como los polifenoles y los taninos (Schwarze, 2007).

4.1. Mecanismos de degradación

Los hongos de pudrición causan cambios químicos y estructurales en la madera. En base a estos cambios se clasifican los distintos tipos de pudrición, usualmente tres: la pudrición blanca, la pudrición castaña y la pudrición blanda (Schwarze *et al.*, 2000):

La **pudrición castaña** (Brown-rot) (Fig. 4A) es causada exclusivamente por basidiomicetes, en su mayoría por especies de la familia Polyporaceae, en asociación con coníferas. Ocurre en árboles en pie, caídos y madera procesada, tanto en albura como en duramen. Los restos de esta pudrición son tan estables que pueden permanecer inalterados en el suelo por siglos (Schmidt, 2006). En este tipo de proceso, el hongo degrada la celulosa y las hemicelulosas de la madera por medios enzimáticos y no enzimáticos (agentes de bajo peso molecular), mientras que la descomposición de la lignina es limitada (permanece ligeramente modificada) (Schmidt, 2006). La pudrición castaña se caracteriza por una degradación rápida de la capa S2, mientras que la capa S3 y la laminilla media enriquecida en lignina presentan resistencia a la degradación. Los agentes no enzimáticos de bajo peso molecular y/o las enzimas celulolíticas penetran a través de la capa S3 (rica en lignina) y difunden en la capa S2, donde degradan completamente a los carbohidratos. Típicamente, los hongos de pudrición castaña no producen zonas de lisis alrededor de sus hifas, a diferencia de los hongos de pudrición blanca. Las hifas están rodeadas por capas mucilaginosas (Schmidt, 2006). Debido a la descomposición preferencial de los carbohidratos, la madera afectada adquiere una consistencia frágil, con una drástica pérdida de resistencia a la flexión luego de un corto periodo de degradación, deshaciéndose luego en cubos hasta convertirse en polvo y la lignina modificada le proporciona su color castaño y consistencia característica (Schwarze, 2007). Los hongos de pudrición castaña no producen por lo general enzimas ligninolíticas, aunque existen estudios que han detectado la presencia de lignina-peroxidasa y manganeso peroxidasa o pérdida o metabolización de lignina en algunas especies. Particularmente se ha observado que en estadios tardíos de degradación es afectada la laminilla media y la pared primaria, ambas ricas en lignina (Schmidt, 2006). La colonización por este tipo de hongos se produce vía sistema radial y se dispersa en el

sistema axial a través de las puntuaciones por medio de microhifas, las cuales crecen dentro del lumen celular (Schmidt, 2006).

La **pudrición blanca** (White-rot) es causada por hongos de los principales grupos de basidiomicetes y más raramente por algunos ascomicetes, de la familia Xylariaceae. El termino pudrición blanca hace referencia a la apariencia decolorada que presenta la madera afectada, debido a que se produce una degradación de la celulosa, las hemicelulosas y la lignina. La velocidad relativa de degradación de los componentes de la madera dependen de la especie fúngica y de las condiciones de la madera. Se distinguen dos formas principales de este tipo de pudrición: la delignificación selectiva y la pudrición simultánea.

La **delignificación selectiva** o **preferencial** (Fig. 4B) se produce cuando, en los primeros estadios de la pudrición, la lignina y las hemicelulosas se degradan más rápido que la celulosa, a través de hemicelulasas y fenoloxidasas tales como lacasas, tirosinasas y peroxidasas (Schmidt, 2006). Se reconoce macroscópicamente por la formación de parches más claros en la madera, en donde permanece la celulosa y se ha degradado la lignina. Inicialmente se degrada la laminilla media, rica en lignina, junto con la lignina de la pared secundaria. A causa de esto, se produce una separación de las células de su matriz. La madera adopta una consistencia fibrosa, pierde rigidez y resistencia a la compresión, aunque en un principio conserva su dureza. Con el paso del tiempo, se produce también una degradación de los carbohidratos, lo que disminuye su resistencia a la tracción, lo que puede ocasionar una caída del árbol.

La **pudrición simultánea** (Fig. 4C) consiste en la remoción de la lignina, celulosa y hemicelulosas aproximadamente a la misma velocidad por acción enzimática y ocurre principalmente en angiospermas. La hifa, con una cubierta de mucílago, crece en el lumen de la célula, adyacente a la capa S3 y la pared celular se rompe en el espacio cercano inmediato a la hifa lo que produce surcos de erosión, como si fuera un río erosionando el suelo. La unión de los surcos trae como consecuencia que el grosor de las paredes celulares lignificadas disminuya desde el lumen hacia la parte más externa de la pared celular. La madera se vuelve quebradiza y termina fracturándose.

Finalmente la **pudrición blanda** (Soft-rot) (Fig. 4D) implica el crecimiento preferencial de las hifas dentro de la capa S2 de la pared secundaria, en cavidades longitudinales al eje celular, en dirección a las microfibrillas de celulosa. Se produce una degradación de la celulosa y las hemicelulosas pero la lignina no es atacada, por lo menos en los primeros estadios (Schmidt, 2006). La madera adopta una consistencia

blanda y en algunos casos quebradiza. Este tipo de pudrición es causada principalmente por ascomicetes, frecuentemente en sus formas anamórficas, aunque se han registrado casos de basidiomicetes que pueden causar este tipo de pudrición (Schwarze *et al.*, 1995). De manera similar a la pudrición simultánea, la degradación de la pared se produce en el espacio cercano inmediato de la hifa. La colonización se produce vía el sistema radial.

Se reconocen dos tipos de pudrición blanda:

Tipo 1: se produce la formación de una serie de cavidades sucesivas con extremos cónicos en forma de L o de T, que siguen las direcciones de las microfibrillas dentro de la capa S2 (Schwarze *et al.*, 2000). En los estadios finales de este tipo de pudrición, lo que permanece es un esqueleto de laminilla media compuesta (Schmidt, 2006).

Tipo 2: se asemeja a una pudrición simultánea localizada. Ocurre particularmente en angiospermas. La degradación se produce desde el lumen hasta la laminilla media compuesta, formando surcos de erosión como muescas en forma de V.

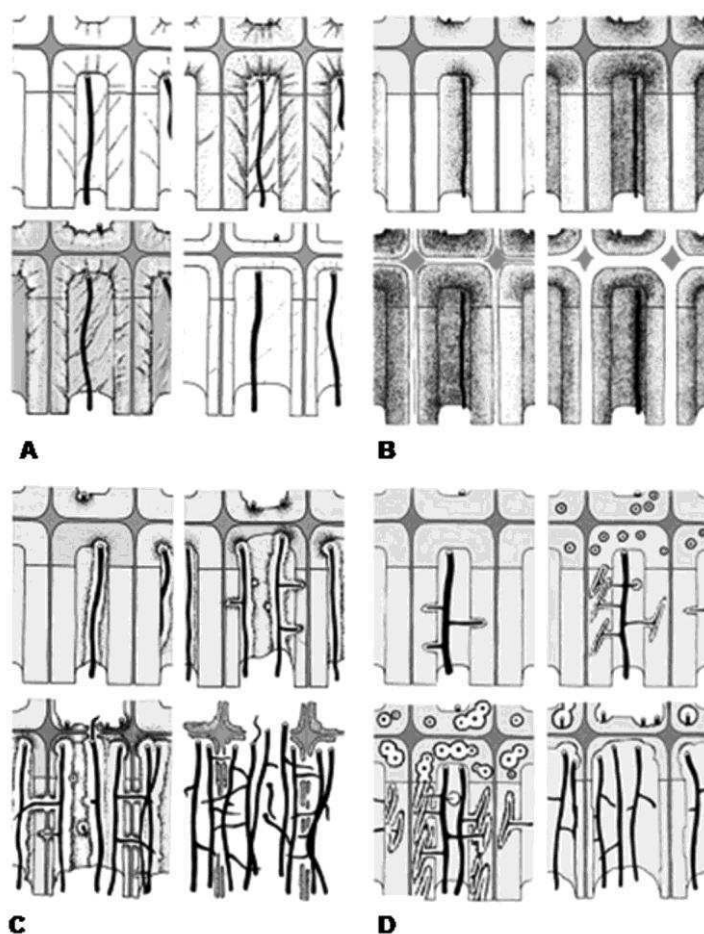


Figura 4: Esquema con las características micromorfológicas de los distintos tipos de degradación fúngica de la madera (Schwarze *et al.*, 2000). (A) Pudrición castaña. (B) Pudrición blanca: degradación selectiva. (C) Pudrición blanca simultánea. (D) Pudrición blanda (Schwarze, 2007).

5. Los endofitos

Los endofitos se definen como organismos que colonizan tejidos vegetales asintomáticos, inter y/o intracelularmente, persistiendo en parte o todo el ciclo de vida de la planta sin causar síntomas de enfermedad (Hyde & Soyong, 2008). Los endofitos fúngicos son un grupo polifilético, representado principalmente por ascomicetes, de amplia distribución (Huang *et al.*, 2008) y han sido encontrados en plantas superiores, palmeras, gramíneas e incluso líquenes. Debido a su importancia dentro de la biodiversidad fúngica se considera que afectan la diversidad y estructura de la comunidad vegetal (Huang *et al.*, 2008).

Existen dos tipos de transmisión de los endofitos entre plantas: la *transmisión horizontal* se produce a partir de las esporas sexuales o asexuales del hongo que entran en contacto con el hospedante y colonizan los tejidos y la *transmisión vertical*, en la cual el hongo es transmitido desde las plantas madres a sus descendientes a través de las semillas infectadas (Saikkonen *et al.*, 2004).

5.1. Clases de endofitos

Se reconocen generalmente dos grandes grupos de hongos endofíticos en base a su taxonomía, hospedantes, funciones ecológicas y relaciones evolutivas: los endofitos clavicipitáceos (*C-endofitos Clase 1*), presentes en un pequeño número de pastos, y los endofitos no-clavicipitáceos (*NC-endofitos*), que pueden recuperarse de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Hasta el momento existe una mayor cantidad de trabajos sobre C-endofitos, debido a su importante impacto en la agricultura y a la escasez de información sobre la importancia ecológica de los NC-endofitos. Estos últimos conforman un grupo altamente diverso y pueden dividirse en 3 clases distintivas, basándose en sus patrones de colonización en el hospedante, mecanismo de transmisión entre generaciones del hospedante, niveles de biodiversidad de especies dentro de cada planta y rol ecológico (Rodríguez *et al.*, 2009):

Los endofitos de **Clase 2** pueden crecer en tejidos aéreos y raíces, pudiendo colonizar extensamente el tejido, principalmente raíces, tallos y hojas. Su diversidad es baja en cada planta. Se transmiten en su mayoría verticalmente, vía semillas, rizomas o

cubiertas de semillas, y también en forma horizontal. La colonización hifal es predominantemente intercelular, sin causar impacto en las células vegetales. Pueden presentar un bajo nivel de esporulación o formación de apresorios en las plantas colonizadas, pero emergen y aumentan su esporulación durante la senescencia vegetal. Un aspecto único de los endofitos de esta clase es su habilidad para conferirle a la planta tolerancia al estrés.

Los endofitos de **Clase 3** sólo se encuentran en tejidos aéreos, en zonas muy localizadas. Presentan una alta diversidad de especies dentro de cada planta o tejido vegetal y se transmiten horizontalmente. Se hallan dentro de tejidos fotosintéticos, flores, frutos, madera y corteza interna.

Los endofitos de **Clase 4** sólo se encuentran en raíces y también son conocidos como endofitos septados oscuros (DSE: dark septate endophytes). Son por lo general ascomicetes con estadio conidial o estériles que forman estructuras melanizadas tales como hifas inter o intracelulares y microesclerocios. Al igual que los endofitos de clase 2 pueden colonizar extensamente el tejido vegetal. A diferencia de las dos clases anteriores, no existen suficientes trabajos que evalúen su biodiversidad dentro de la planta. Su transmisión es horizontal y tienen una distribución cosmopolita, prevaleciendo en ambientes con alto nivel de estrés para las plantas.

5.2. Rol de los endofitos de madera

La relación entre el endofito y la planta puede ser variada. Ciertos trabajos sugieren la existencia de una relación mutualista (Arnold *et al.*, 2003) mientras que otros indicarían relaciones patogénicas por parte de estos organismos fúngicos (Arnold, 2007; Sieber, 2007). Existen diversos estudios del rol de los endofitos dentro de la planta y del rol de los endofitos como saprófitos o patógenos. Se ha encontrado que muchos de ellos, presentes en hojas y tejidos leñosos, pueden ser específicos de un género, especie o planta hospedante y que esta especificidad dependería de sustancias presentes en las hojas o madera y de la colonización inicial por parte del endofito (Arnold, 2007).

Algunos endofitos pueden ser patógenos latentes. Sieber (2007) planteó que los endofitos “patógenos” han co-evolucionado con sus hospedantes y por lo tanto no poseen una alta virulencia. Estos patógenos suelen esporular en ciertos episodios como la caída de las hojas, la producción de fruto o la presencia de estrés.

Los endofitos de madera pueden adoptar un estado de dormición dentro del xilema durante el crecimiento del árbol. Las razones de que adopten este estado latente pueden ser un régimen gaseoso adverso o una baja disponibilidad de nitrógeno (Hendry *et al.*, 2002; Slippers & Windfield, 2007). El hongo reanuda su actividad al darse las condiciones ambientales apropiadas, una reducción del contenido de agua en la albura, un incremento del nivel de oxígeno y/o la disponibilidad de nutrientes y una reducción de las defensas del hospedante (Sieber, 2007). La limitación de oxígeno y disponibilidad de nutrientes podrían controlar el comportamiento de hongos comúnmente patógenos (Baum *et al.*, 2003).

5.3. Estudios en Argentina sobre endofitos

La mayoría de los estudios sobre endofitos en nuestro país se han realizado sobre pastos. Iannone & Cabral (2006), Iannone *et al.* (2011), Novas *et al.* (2007), entre otros trabajos, han investigado la relación mutualista entre el endofito *Neotyphodium* y sus hospedantes, incrementando el crecimiento de la planta y brindándole resistencia contra herbívoros, patógenos y factores abióticos de estrés.

Entre los estudios sobre endofitos de hoja, se pueden mencionar los trabajos de Cabral (1985) y Bertoni & Cabral (1988) sobre *Eucalyptus viminalis*, de Durán *et al.* (2005) sobre *Citrus limon* en Tucumán y el trabajo de Novas & Carmarán (2008) sobre *Broussonetia papyrifera*, *Celtis occidentalis* y *Ligustrum lucidum* de la Reserva Dr. Carlos Spegazzini en Buenos Aires.

Finalmente de Errasti *et al.* (2010) se enfocaron en los endofitos de madera de tres especies arbóreas naturalizadas e invasivas en Argentina.

5.4. Basidiomicetes endofíticos

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los endofitos conocidos pertenecen a la clase ascomicetes (Arnold, 2007). Existen, sin embargo, cada vez mayor cantidad de trabajos en los cuales se obtuvieron aislamientos de basidiomicetes endofíticos, como los de Baum *et al.* (2003) sobre madera de *Fagus sylvatica*; Rungjindamai *et al.* (2008) a partir de la palmera *Elaeis guineensis* y Crozier *et al.* (2006) y Thomas *et al.* (2008) sobre tallos y vainas de *Theobroma cacao*. Oses *et al.* (2006; 2008) aislaron cepas de basidiomicetes a partir de especies leñosas y observaron que estas poseían potencial

para causar una pudrición blanca no selectiva en la madera bajo las condiciones apropiadas, sugiriendo que ciertos hongos de pudrición poseerían una fase endofítica dentro de su ciclo de vida, dentro de la cual no degradarían la madera. En Argentina, de Errasti *et al.* (2010) aislaron cepas de *Coprinellus micaceus* como endofito de madera de *Broussonetia papyrifera* y *Celtis occidentalis*.

Los endofitos de madera constituyen, hasta el momento, un aspecto poco estudiado en los ecosistemas, lo que conlleva a que la importancia de esta interacción no sea entendida extensamente.

6. Métodos de identificación

6.1. Estudio de caracteres vegetativos

En numerosas ocasiones en los árboles en pie afectados por hongos de pudrición no se evidencia signos del patógeno (fructificación), en consecuencia en estos casos solamente se cuenta con el cultivo puro del mismo para identificarlo. Para estos casos, existen claves que se basan en los caracteres morfológicos vegetativos.

Davidson *et al.* (1942) fueron los primeros en utilizar los caracteres macro (olor, reacción de oxidasas y velocidad de crecimiento) y micromorfológicos en cultivo para la creación de un código de identificación. Por su parte Nobles (1948) describió 126 especies de basidiomicetes degradadores de madera a partir de características morfológicas y fisiológicas *in vivo* e *in vitro* tales como el color de la mata miceliana, el cambio de color del medio de cultivo, la velocidad de crecimiento, el borde en la zona de crecimiento del micelio, tipo de pudrición y tipo de hospedante, entre otros. Más tarde estos estudios fueron ampliados (Nobles, 1958; 1965), con el agregado de más especies y tomando en especial consideración características tales como la producción de oxidasas extracelulares, la presencia y distribución de fíbulas, y la formación de hifas esqueletales. Las especies con ausencia de oxidasas fueron consideradas primitivas. Los grupos creados a partir de estas características resultaron en su mayoría concordantes con aquellos establecidos a partir de estudios morfológicos de basidiomas. Stalpers (1978) realizó un trabajo con su propio código, a partir de una recopilación de la información existente hasta ese momento y con la inclusión de caracteres tales como la textura de la mata miceliana, el ancho de la hifa y la presencia de tirosinasa.

En Argentina Deschamps & Wright (1975) publicaron una clave en base a caracteres de cultivo para basidiomicetes xilófagos presentes en el país, a partir de una recopilación de trabajos propios (Wright & Deschamps, 1972; 1975; Wright *et al.*, 1973). Más adelante, este tipo de estudios fue empleado en numerosos trabajos, ampliando la cantidad de especies descritas (Rajchenberg, 1996; Rajchenberg & Greslebin, 1995; Robles *et al.*, 2011; Sede & Lopez, 1999a; 1999b; Wright & Deschamps, 1976).

La principal desventaja de estos métodos de identificación es la dificultad de obtener cultivos axénicos a partir de madera degradada. El método de Nobles insume seis semanas y presenta dificultad en la identificación en particular cuando se trabaja con taxones cercanos entre sí debido a que no se cuentan con suficientes caracteres para distinguirlos (Stalpers, 1978). En algunos casos es posible realizar ensayos de compatibilidad sexual, aunque estos requieren de una gran cantidad de tiempo (Dai *et al.*, 2003).

6.2. Reacción de oxidasas

El tipo de pudrición que causa una especie es considerada una importante característica taxonómica (Davidson *et al.*, 1938; Nobles, 1948), por lo que es también importante detectar en cultivos puros las enzimas responsables de la descomposición de lignina. Estas enzimas son fenoloxidasas, especialmente lacasa y peroxidasa, que son exoenzimas. La producción de estas enzimas permitiría diferenciar en cultivo entre hongos de pudrición blanca y hongos de pudrición castaña (Stalpers, 1978). En consecuencia, la presencia o ausencia de oxidasas (reacción positiva o negativa) es utilizada en las claves patrón para diferenciar en cultivo especies de basidiomicetes (Deschamps & Wright, 1975; Nobles, 1948; 1965).

Existen varios tipos de medios como el ácido gálico, ácido tánico y guayacol, usados sobre hymenomicetes, que revelan la presencia de oxidasas. Los hongos de pudrición blanca, a diferencia de los de pudrición castaña, causan un halo de coloración o zona de difusión en estos medios, los cuales son atribuidos a la presencia de una enzima fenoloxidasa extracelular, que se ha identificado como lacasa. En algunas especies podría encontrarse una tirosinasa extracelular, aunque otros autores consideran que en la mayoría de los casos sería intracelular. En el caso de que fuera extracelular, estos medios, particularmente el de guayacol, la estarían detectando aunque su cantidad

sería ínfima comparada con la de la lacasa (Nobles, 1958; Stalpers, 1978). El patrón de tirosinasa difiere del de otras enzimas y parece tener valor taxonómico. Sin embargo, al ser la tirosinasa una endoenzima, su observación puede verse dificultada. Además un resultado negativo no necesariamente indica la ausencia de esta enzima. Los medios para detectarla son el paracresol (p-cresol) 1,5% y el medio con tirosina 0,2% (Boidin, 1951).

6.3. Estudio de caracteres moleculares

Desde la década de los 80 se han empleado técnicas moleculares con el fin de detectar micelio en la madera y/o identificar a qué especies corresponden, como alternativa a los métodos tradicionales basados en el basidioma o los cultivos puros. Inicialmente se utilizaron técnicas como SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) para detectar la diversidad entre hongos de pudrición (Vigrow *et al.*, 1991) y técnicas inmunológicas para identificar a los agentes xilófagos en estadios tempranos de pudrición sin aislamiento y cultivo previo (Jellison & Goodell, 1988). La desventaja de esta última técnica es que con frecuencia se producían reacciones con organismos que no eran el blanco original. Desde la década del '90, se comenzaron a utilizar principalmente técnicas de ADN, tales como el análisis RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) (Schmidt & Moreth, 1998), polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Kim *et al.*, 2006) y análisis de microsatélites (RAMS) (Guo *et al.*, 2004). Todos ellos producen huellas genéticas (DNA fingerprints) de los individuos estudiados. En los últimos años se ha desarrollado la técnica de PCR múltiple (multiplex PCR) con primers específicos para cada taxón (SSPP: species-specific priming PCR), diseñados a partir de la secuencia ITS (Guglielmo *et al.*, 2007; 2008; Nicolotti *et al.*, 2009). Según Schmidt *et al.* (2012) el uso de RFLP's y de SSPP son apropiados para identificar organismos solamente en hábitats con un número limitado de especies, a diferencia de lo que ocurre en árboles de ambientes urbanos.

En la actualidad, se utiliza comúnmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con primers estándares, para detectar e identificar géneros y especies (White *et al.*, 1990), amplificando de esta manera unidades repetidas de ADN ribosomal (ADNr), las cuales consisten en las subunidades 18, 5.8, 28 y 5S ARNr, interrumpidas por los espaciadores internos de transcripción (ITS: internal transcribed spacers) y los

espaciadores intergénicos (IGS: intergenic spacers). El arreglo repetido (*en tándem*) y los sitios altamente conservados de los primers permiten, en la mayoría de los casos, amplificar el ADN fúngico casi en su totalidad, aun cuando se cuente con una cantidad reducida de muestra o esta sea de baja calidad (Jasalavich *et al.*, 2000). Particularmente las regiones ITS1 e ITS2 permiten distinguir diferentes especies, poblaciones y grupos subespecíficos (Schmidt *et al.*, 2012). Asimismo, cuentan con la ventaja de permitir identificar prácticamente todos los tipos de hongos. Sin embargo, en algunos casos, como en el género *Heterobasidion*, la región ITS no muestra suficiente variabilidad entre especies. En otros casos puede ocurrir que haya variabilidad infraespecífica de esta región, por lo que se suele utilizar otros genes (Schmidt *et al.*, 2012). En algunos trabajos el ITS amplificado es restringido por endonucleasas de restricción que producen patrones polimórficos (RFLP's) (Adair *et al.*, 2002; Fischer & Wagner, 1999), lo cual ha mostrado también ser de utilidad para resolver relaciones entre taxones. A su vez, los genes ribosomales estructurales, como la subunidad grande y pequeña de ADNr (nuc SSU y nuc LSU), han resultado de utilidad para resolver relaciones filogenéticas a nivel supraespecífico. La subunidad menor mitocondrial (mt SSU) de ADNr incluye dominios variables y conservados, lo que la provee de marcadores moleculares que permiten resolver relaciones a niveles supra e infraespecíficos (Guglielmo *et al.*, 2007).

Desde hace algunos años, se han comenzado a utilizar diversas regiones genómicas para complementar o reemplazar al uso de regiones de ADN ribosomal nuclear o mitocondrial, como es el caso del gen de la β -tubulina el cual ha sido utilizado en varias oportunidades en trabajos con basidiomicetes (Lesage-Meesen *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012).

En nuestro país Gottlieb *et al.* (2000; 2002) estudiaron los géneros *Ganoderma* e *Inonotus* de Argentina a través de la amplificación de regiones ITS y análisis de RFLP's, obteniendo un bajo nivel de variación de la región ITS para el género *Ganoderma* en contraposición a un alto grado de variación de esta región en el género *Inonotus*. Robles *et al.* (2011; 2012) evaluaron la utilidad de las secuencias ITS como herramientas taxonómicas de poblaciones locales de hongos de pudrición, encontrados en arbolado urbano. La utilización de estas secuencias permitió lograr y corroborar identificaciones en algunos casos de especies de basidiomicetes. La falta de secuencias a nivel regional, sin embargo, apareció como uno de los principales obstáculos para la detección de agentes de pudrición de la madera en árboles urbanos.

La detección e identificación de hongos xilófagos directamente a partir de madera ha sido investigado por diversos autores. Jasalavich *et al.* (2000) hicieron pruebas con CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) en presencia de B-mercaptoetanol para extraer ADN fúngico de madera de abeto, con resultados dispares. Más tarde, Bahnweg *et al.* (2002) desarrollaron primers específicos para PCR para *Heterobasidion annosum sensu lato*, con el fin de detectar y cuantificar a este patógeno en muestras de madera y raíces de abeto noruego. Gonthier *et al.* (2003) obtuvieron secuencias parciales de ITS a partir de madera sintomática de pino, por medio de la utilización de primers específicos de PCR. Al comparar con secuencias preexistentes observaron que una de sus secuencias se correspondía, con un alto índice de homología, con *Heterobasidion acervum*. Las técnicas para lograr extraer ADN fúngico directamente de madera se han ido simplificando, con la creación de primers específicos para diversos taxones, como complemento de los primers estándares ITS1 e ITS4.

7. Ensayos de pérdida de peso

Los estudios de degradación *in vitro*, si bien no pueden ser considerados como reflejo fiel del comportamiento de los hongos en medios naturales resultan útiles para comparar la actividad degradadora de especies fúngicas en condiciones controladas similares (Job & Wright, 1986; Mielnichuk & Lopez, 2007).

La determinación de la pérdida de peso seco de la madera a causa de un hongo de pudrición es una metodología ampliamente utilizada como estimación general de la degradación de la madera (Oses *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2011; Schwarze *et al.*, 1995; Worrall *et al.*, 1997). La pérdida de peso varía dependiendo de la especie xilófaga estudiada o del tipo de madera utilizado (Adaskaveg *et al.*, 1990).

8. Control biológico

Se denomina *control biológico* o *biocontrol* a la utilización de organismos vivos, además del hombre, con el fin de reducir la densidad de población o impacto de un organismo patógeno o parásito (Eilenberg *et al.*, 2001). De esta manera se disminuyen las actividades del patógeno que son causantes de enfermedad, que involucran, crecimiento, agresividad, virulencia o procesos que determinan el grado de infección, desarrollo de síntomas y reproducción (Cook & Baker, 1983).

Las estrategias que actúan en el control biológico incluyen 1) individuos o poblaciones avirulentas o hipovirulentas de la especie patogénica; 2) el hospedante manipulado genéticamente para que sea resistente al patógeno.; 3) antagonistas del patógeno, microorganismos que interfieren en la supervivencia o actividades del patógeno. Este último caso es el que suele practicarse en los casos de patología vegetal (Cook & Baker, 1983). Muchos tipos de agentes pueden actuar como fitopatógenos: hongos, bacterias, nematodos, Stramenopila, semillas de plantas, algas, virus y viroides (Cook & Baker, 1983).

Existen microorganismos, mayormente hongos, antagonistas de hongos de pudrición que complementan la estrategia de compartimentalización que presentan los árboles para resistir a la degradación a causa de estos agentes xilófagos. Estos antagonistas son habitantes naturales de la madera y la corteza y pueden ser especialmente beneficiosos oponiéndose al avance de hongos de pudrición en heridas recientes en el árbol, a través de la competencia, producción de metabolitos o interferencia hifal. Pueden proveer de cierta protección al árbol durante el periodo crítico en que la herida está en plena cicatrización y la compartimentalización es incipiente (Cook & Baker, 1983). La búsqueda de agentes de control biológico de hongos degradadores de madera se ha propuesto como alternativa al uso de preservantes químicos, como el CCA (cobre-cromo-arsénico) que tienen impacto ambiental por su toxicidad (Brown & Bruce, 1999). En ciertas comunidades, como la micobiota presente en corteza, la variación de los organismos respecto a sus capacidades antagonistas puede ser muy amplia. Esta variabilidad puede proveer de una mayor cantidad de potenciales antagonistas por sobre la aplicación masiva de un único agente de biocontrol (Buck & Traquair, 1998).

Trichoderma es el género más estudiado como agente biocontrolador y en muchas ocasiones ha mostrado un efecto protector contra ciertos hongos degradadores (Bruce & Highley, 1991; Bruce *et al.*, 2005; Highley & Ricard, 1988). En árboles urbanos se ha registrado a *Trichoderma atroviride* como un buen antagonista contra diferentes especies de basidiomicetes (Schubert *et al.*, 2008). Existen otras especies de micromicetes que, aunque en menor medida, han sido evaluadas como potenciales biocontroladores. Uno de ellos es *Epicoccum purpurascens* (Mielnichuk & Lopez, 2007), el cual tendría un actividad antagónica contra ciertos hongos fitopatógenos y otro ejemplo es *Scytalidium lignicola* (Highley, 1990), el cual presenta efectos inhibitorios y propiedades antibióticas.

En ciertos casos, se han utilizado basidiomicetes con capacidad degradadora como antagonistas de hongos de pudrición más agresivos. Ejemplos de esto son los casos de *Phlebiopsis gigantea*, sobre la cual se han realizado diversos estudios, principalmente en el hemisferio norte (Vainio *et al.*, 2005), *Resinicium bicolor* como controlador de *Heterobasidion annosum* (Holmer & Stenlid, 1997), y *Coriolus versicolor* y *Stereum hirsutum* sobre *Armillaria* sp. (Pearce & Malajczuk, 1990).

Diversos trabajos han investigado la potencialidad de ciertos endofitos como agentes de control biológico. Bailey *et al.* (2008), Evans *et al.* (2003) y Mejía *et al.* (2008) evaluaron la capacidad antagónica de la micobiota endofítica de *Theobroma cacao* y *Theobroma gileri* contra patógenos comunes de estos hospedantes.

En Argentina, existen escasos trabajos sobre control biológico de basidiomicetes xilófagos. Bianchinotti & Lopez (1999) evaluaron la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* contra hongos degradadores frecuentes en el arbolado urbano: *Ganoderma platense*, *Rigidoporus ulmarius* e *Inonotus rickii*. En Pildain & Lopez (2000) y en el ya mencionado trabajo de Mielnichuk & Lopez (2007), se efectuaron estudios similares con *Epicoccum purpurascens* (nombre actual: *Epicoccum nigrum*) como potencial agente controlador.

Finalmente, en el contexto del arbolado urbano varios interrogantes toman una gran relevancia considerando el impacto de este sistema en las vidas humanas: ¿Cuáles son los patógenos de madera de mayor importancia? ¿Existe alguna relación entre su presencia y los niveles de disturbios en el ambiente urbano? ¿Podría el estudio de una interacción múltiple, como en el caso de endofitos-patógenos-planta, brindar potenciales herramientas de prevención y control de enfermedades fúngicas?

En la búsqueda de algunas respuestas se perfiló el camino de esta tesis.



Objetivos & Hipótesis

Objetivo general

Obtener datos sobre las poblaciones de hongos filamentosos que conviven en la madera en árboles urbanos que contribuyan a la detección temprana de agentes xilófagos, el pronóstico de posibles riesgos de fractura y la implementación de calendarios de reposición, acciones terapéuticas o de control biológico.

Para esto se busca:

- ❖ Caracterizar el biodeterioro de madera en árboles de la Ciudad de Buenos Aires y los agentes fúngicos determinantes
- ❖ Investigar la presencia de endofitos fúngicos en árboles de la ciudad de Buenos Aires.
- ❖ Determinar relaciones causales entre los agentes fúngicos de biodeterioro y los endofitos fúngicos presentes en la madera.
- ❖ Analizar potenciales aplicaciones de las relaciones causales detectadas y de la acción controladora de habitantes naturales de la madera en relación con medidas de manejo del arbolado público.

Objetivos específicos

- ❖ Aislar, identificar y caracterizar a los agentes xilófagos en plátanos de la Ciudad de Buenos Aires a partir de estudios de caracteres vegetativos en cultivo, presencia de oxidasas y evaluación de su capacidad degradadora *in vitro* sobre madera sana de plátano
- ❖ Describir los principales cambios anatómicos generados por *Bjerkandera adusta* e *Inonotus rickii*, dos importantes xilófagos sobre arbolado de la Ciudad de Buenos Aires, en madera de plátano, a través de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.
- ❖ Caracterizar la micobiota endofítica de madera de plátano
- ❖ Describir a nivel morfológico y molecular cepas endofíticas y patogénicas de basidiomicetes de la madera, contribuyendo así al desarrollo de una base de datos local de secuencias de ADN.

- ❖ Determinar las relaciones filogenéticas entre cepas endofíticas y xilófagas de la misma especie o género.
- ❖ Establecer la capacidad de micromicetes habitantes naturales de corteza para controlar a los agentes xilófagos más riesgosos.
- ❖ Analizar si aquellos factores que favorecen el biodeterioro de los árboles pueden ser importantes en el establecimiento de la comunidad endofítica.

Hipótesis

- ❖ La caracterización de las comunidades de hongos xilófagos puede contribuir en la estimación de la progresión del daño en la madera y en posteriores decisiones de manejo.
- ❖ El agente biológico, la edad del árbol y las condiciones del sitio de implantación se relacionan con el estado de avance de las pudriciones en la madera y por lo tanto ser utilizados como indicadores del riesgo de deterioro.
- ❖ En árboles asintomáticos se encuentran cepas de basidiomicetes en estado de latencia, como endofitos, que poseen la capacidad de causar patologías en la madera.
- ❖ Una alta biodiversidad de endofitos en la madera podría influir en el establecimiento de agentes xilófagos en árboles cercanos.
- ❖ En la micobiota asociada al plátano existen cepas saprofitas o endofíticas capaces de disminuir y/o retardar la colonización de la madera por basidiomicetes xilófagos.
- ❖ Entre los factores que favorecen el biodeterioro de los árboles, la edad de los ejemplares influiría en el establecimiento de la comunidad endofítica.



Materiales & Métodos

1. Área de estudio y planificación de muestreos

La Ciudad Autónoma de Buenos Aires (34° 36' 43'' S; 58° 25' 02'' O), capital de la República Argentina, tiene una superficie de 203 km² y un número estimado de 2.891.082 habitantes (INDEC, 2011). Se encuentra al borde de la llanura pampeana, con una escasa pendiente, que sumada a la precipitación promedio anual, de alrededor de 1.146 mm, la convierte en un área subtropical de riesgo hídrico. El clima de Buenos Aires es templado pampeano, con veranos calurosos e inviernos frescos, más moderados en los últimos años, y temperaturas medias anuales de alrededor 17°C (Plan de Acción Cambio Climático, 2010).

Se consideraron 4 sitios de muestreo: **Sitio A**, conformado por un área residencial en la zona norte, **Sitio B**, comprendido por barrios céntricos con alto disturbio antrópico y **Sitio C** en un área residencial e industrial en la zona sur, conforme a los sitios de muestreo ya delimitados por Robles *et al.* (2011). El cuarto sitio, **Sitio D**, se ubicó en el Predio de Ciudad Universitaria, situado entre barrios residenciales y el parque natural de Ciudad Universitaria, este último adyacente al Río de la Plata (Fig. 5). Si bien los sitios de muestreo mostraron distintos niveles de disturbio, la práctica de la poda no fue tomada en cuenta como un factor ya que la intensidad de poda se consideró similar en todos los sitios de muestreo. Las características de los diferentes sitios de muestreo en cuanto a sus indicadores de disturbio antrópico se muestran en la sección de Anexo.

Teniendo en cuenta el área comprendida en cada sitio de muestreo, se calcularon para cada uno las coordenadas geográficas representativas:

Sitio A: 34° 34' 54,70"S / 58° 28' 58,44"O

Sitio B: 34° 36' 34,17"S / 58° 23' 54,10"O

Sitio C: 34° 39' 24,60"S / 58° 29' 14,59"O

Sitio D: 34° 32' 40,40"S / 58° 26' 38,90"O

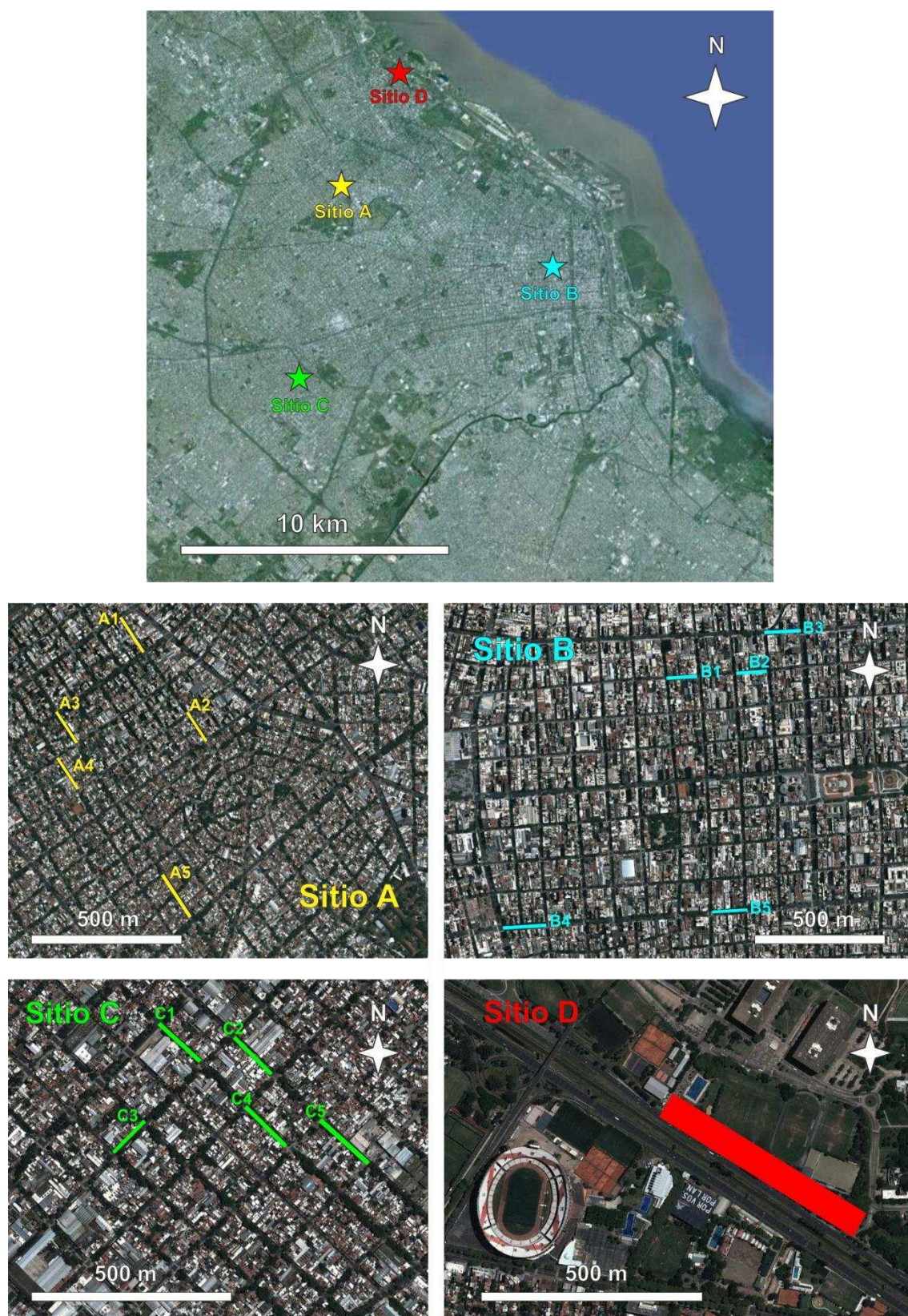


Figura 5: Mapa de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Los puntos marcados indican los sitios muestreados. Detalle de los sitios. Las líneas en color indican las cuadras muestreadas para los Sitios A-C y el área de muestreo del Sitio D (Fuente: Google Earth versión 6.1.0.5001).

En los Sitios A, B y C se trabajó en 5 cuadras (alrededor de 100 m de largo) por sitio, no contiguas y con plátanos de alineación en una o ambas veredas. Se utilizó el Censo del Arbolado Urbano del 2001, confeccionado por el Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, como base para la delimitación de las cuadras de los diferentes Sitios en donde hubiera presencia de plátanos.

En la Tabla 1 se detalla la ubicación geográfica de cada cuadra muestreada.

Sitio	Cuadra	Coordenadas geográficas	
		Latitud	Longitud
A	A1	34° 34' 35,68"S	58° 29' 3,72"O
	A2	34° 34' 47,62"S	58° 28' 53,58"O
	A3	34° 34' 47,85"S	58° 29' 13,97"O
	A4	34° 34' 53,78"S	58° 29' 13,99"O
	A5	34° 35' 10,26"S	58° 28' 55,96"O
B	B1	34° 36' 21,59"S	58° 23' 50,28"O
	B2	34° 36' 20,92"S	58° 23' 39,91"O
	B3	34° 36' 16,10"S	58° 23' 35,04"O
	B4	34° 36' 52,47"S	58° 24' 14,20"O
	B5	34° 36' 50,70"S	58° 23' 43,48"O
C	C1	34° 39' 20,66"S	58° 29' 22,51"O
	C2	34° 39' 21,62"S	58° 29' 15,51"O
	C3	34° 39' 28,33"S	58° 29' 27,65"O
	C4	34° 39' 27,30"S	58° 29' 14,03"O
	C5	34° 39' 28,45"S	58° 29' 6,79"O

Tabla 1: Coordenadas geográficas de las cuadras muestreadas en los Sitios A, B y C. Se consideró la mitad de cada cuadra como indicador de la ubicación geográfica.

El Sitio D corresponde a un área de aproximadamente 0,4 km² perteneciente al predio de Ciudad Universitaria, lindante con la Avenida Lugones. Estos ejemplares están cercanos a una avenida con alta circulación de automóviles, ubicándose en un parque (no alineación). La Ciudad Universitaria es un zona de la Ciudad de Buenos Aires que presenta características particulares, especialmente en su suelo, ya que forma parte de terrenos que han sido rellenados durante décadas (Marcomini & López, 2004).

Las distancias medidas en km entre los diferentes sitios fueron las siguientes:

	Sitio A	Sitio B	Sitio C	Sitio D
Sitio A	--	--	--	--
Sitio B	8,34	--	--	--
Sitio C	8,33	9,71	--	--
Sitio D	5,46	9,34	13	--

Las coordenadas geográficas y distancias fueron obtenidas por medio del programa Google Earth (versión 6.1.0.5001).

Los muestreos se realizaron durante Octubre y Diciembre de 2010 y Febrero y Agosto de 2011. La totalidad de los árboles de cada cuadra se consideraron como árboles inspeccionados (**AI**). Para cada árbol inspeccionado se evaluó su estado general y se calculó su diámetro aproximado a la altura del pecho (DAP). A partir del registro del perímetro se utilizó la siguiente fórmula de circunferencia asumiendo que el tronco tenía una forma cercana al círculo:

$$DAP = \frac{CAP}{\pi}$$

DAP= diámetro a la altura del pecho (alrededor de 1,4 m).

CAP= circunferencia a la altura del pecho.

Estos valores de DAP pueden usarse, con precauciones, como indicadores de una edad relativa del árbol (Maco & McPherson, 2003; Robles *et al.*, 2011). Se consideró el trabajo de Linsen *et al.* (2005) sobre ejemplares de *Platanus acerifolia* para establecer una relación entre DAP y edad aproximada (Fig. 6).

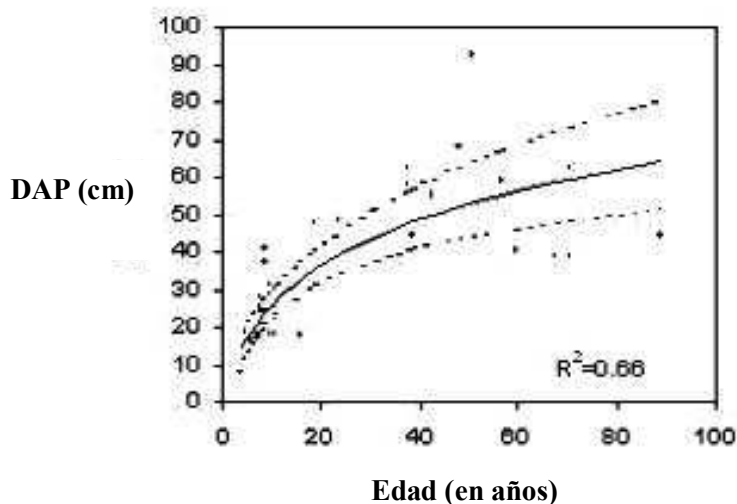


Figura 6: datos de DAP (diámetro a la altura del pecho) de ejemplares de *Platanus acerifolia* en función de la edad (en años), medido en años (Linsen *et al.* 2005).

2. Muestreo de árboles sintomáticos y procesamiento de muestras

En cada cuadra de los Sitios A, B y C se tomaron muestras de madera de todos aquellos ejemplares vivos de *P. acerifolia* con sintomatología tales como canchros, orificios o descortezamiento. Estos árboles fueron denominados posteriormente como **AS** (árboles sintomáticos). Se designaron como árboles colonizados (**AC**) a aquellos en los que se detectó la presencia de basidiomicetes. Las muestras (**MM**= muestras de madera) fueron tomadas en las áreas donde se observaron los síntomas por medio de un martillo sonda (Haglöf, Finlandia). Las cavidades y canchros, si bien no indican necesariamente la presencia de hongos de pudrición, son posibles vías de entrada de estos patógenos al árbol (Robles *et al.*, 2011). Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno y procesadas dentro de las 24 horas.

Bajo flujo laminar las muestras de madera fueron esterilizadas superficialmente (etanol 50% por 30 segundos; hipoclorito de sodio – lavandina comercial 55 g/l 1:3 durante 1 minuto; etanol 50% por 30 segundos) y flameadas durante unos segundos para luego ser colocadas en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con Extracto de Malta (MEA) 1,25% con cloranfenicol (100 mg/l) (MeClo) y cajas con un medio selectivo para basidiomicetes (BDS) modificado a partir del medio propuesto por Worrall (1991) (medio con fungicida benomil, cloranfenicol y dicloran). Osés *et al.* (2008) utilizaron un medio de cultivo similar con la finalidad de obtener basidiomicetes endofíticos de madera. Se obtuvieron en promedio 8 fragmentos por cada MM.

3. Muestreo de árboles asintomáticos y procesamiento de muestras

En cada cuadra de los Sitios A, B y C se recolectaron muestras de hasta 2 ejemplares de plátanos en pie asintomáticos (**AA** = árboles asintomáticos) elegidos al azar por medio de un taladro de Pressler (Suunto, Vanta, Finlandia). Las muestras consistieron en segmentos cilíndricos de 10 x 1 cm aproximadamente, denominadas unidades (**UM**= unidades de madera). De cada árbol se extrajeron 3 unidades en el fuste, dos a la altura del pecho y uno en la base del tronco, con la finalidad de realizar un posterior análisis espacial de las especies encontradas. Las unidades fueron guardadas en tubos Falcon (15 ml) de polipropileno estériles y transportadas al laboratorio (Fig. 7). Dos de las unidades tomadas de árboles asintomáticos, una proveniente de la base del tronco y otra de la parte media, a la altura del pecho, fueron procesadas dentro de las 24 horas.

Con el objetivo de estimular el desarrollo de propágulos latentes, la unidad restante de cada árbol asintomático fue dejada en el tubo Falcon a temperatura ambiente y oscuridad para su procesamiento luego de 3 meses.

Tanto el martillo sonda como el taladro de Pressler fueron rociados con etanol 70% después de cada uso. Todas las muestras y unidades de madera fueron rociadas con etanol 70% antes de colocarlas en las bolsas y tubos Falcon. Los orificios resultantes del muestreo fueron sellados con silicona para reducir el riesgo de una infección posterior en la madera (Oses *et al.*, 2008).

Las unidades fueron procesadas de la siguiente forma: se dividieron en 3 segmentos de aproximadamente el mismo largo. De acuerdo a la orientación de la unidad en el árbol los segmentos se denominaron *D1*- correspondiente a la porción más externa, es decir más cercana a la corteza-, *D2*- la porción media y *D3*- correspondiente a la porción más interna. Cada segmento fue dividido a su vez en varios fragmentos de aproximadamente 4–5 mm de largo para ser sembrados en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con Extracto de Malta (MEA) 1,25 % con cloranfenicol (100 mg/l) (McClo) y cajas con medio selectivo para basidiomicetes (BDS). En consecuencia, se obtuvieron dos cajas de Petri, una con cada medio de cultivo, por cada uno de los 3 segmentos (24 fragmentos por cada UM).

Todas las cajas de Petri fueron examinadas cada 2–3 días con el fin de obtener cultivos axénicos (Fig. 8). Los fragmentos de madera que luego de un mes no presentaron crecimiento de micelio fueron colocados en cajas de Petri con medio

nutritivo de extracto de malta-peptona-glucosa (MEP). Los aislamientos obtenidos, provenientes de madera de árboles sintomáticos y asintomáticos, se observaron bajo microscopio óptico para detectar aislamientos de basidiomicetes. Los criterios aplicados para considerar un aislamiento como potencial basidiomicete fueron: la presencia de fíbulas, la ausencia de esporulación o la presencia de esporas asexuales típicas de Basidiomycota (clamidosporas, conidios, artrosporas), la apariencia de la colonia en cuanto al color y textura del micelio y la tasa de crecimiento. Los aislamientos obtenidos a partir de árboles asintomáticos fueron considerados en adelante como endofitos, mientras que los aislamientos obtenidos de árboles sintomáticos fueron considerados saprófitos, y a los aislamientos de basidiomicetes o de ascomicetes con potencial degradador (Xylariaceae) se los considero como patógenos.



Figura 7: unidad de madera tomada de un árbol asintomático, fragmentos a ser sembrados en cajas de Petri y tubo Falcon.



Figura 8: aislamiento a partir de fragmentos de madera de árboles asintomáticos.

4. Identificación de especies

Los aislamientos considerados potenciales basidiomicetes, aislados como endofitos y como patógenos, fueron cultivados en MEA 1,25 % (Difco Lab.) a 24° en oscuridad

según el método establecido por Nobles (1948). Semanalmente, durante un lapso de 6 semanas, se observaron los caracteres macro y micromorfológicos de las colonias. Se utilizaron claves de caracteres de cultivos (Nobles, 1948; 1965; Stalpers, 1978; Wright & Deschamps, 1976) para su identificación.

El resto de los aislamientos fúngicos endofíticos fueron cultivados regularmente en MEA 2% o en medio papa-glucosa agarizado (APG) para su identificación. Los cultivos se examinaron periódicamente para detectar esporulación. Se utilizaron diversas claves para la identificación de los organismos tales como las de Carmichael *et al.* (1980), Ellis (1971), Seifert *et al.* (2011) y Von Arx (1981). Se utilizó la metodología propuesta por Klich (2002) para la identificación de los aislamientos de *Aspergillus* sp., analizándose el comportamiento de las colonias al cabo de una semana, en medios de cultivo especiales: Czapeck Yeast Agar (a 25°C y 37 °C), Czapeck Agar y Extracto de Malta con Peptona (a 25°C).

Todas las estructuras micromorfológicas fueron medidas con un aumento de 400X y 1000X con un microscopio estereoscópico Boeco BTB-3A (Alemania) y un microscopio binocular Zeiss Axioskop (Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Olympus modelo C-5060 Wide Zoom 5,1 megapíxeles (Tokio, Japón). Se utilizó KOH 5 % p/v y floxina 1 % p/v como medios de montaje para microscopia óptica. Para detectar estructuras en microscopio de epifluorescencia (UV) Zeiss Axioskop se utilizó como medio de montaje calcoflúor 0,05 % p/v (Romero & Minter, 1988). Las fotos no microscópicas fueron tomadas con cámara digital Sony Cybershot® DSC-W35 7,2 megapíxeles (China) y cámara Samsung ST93 16,1 megapíxeles (Brasil). Se utilizó la nomenclatura actualmente aceptada de especies de acuerdo a la base de datos online *Mycobank* (<http://www.mycobank.org/>) (Crous *et al.*, 2004). Los organismos identificados fueron incorporados a la Colección de Cultivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (BAFCcult).

5. Estimadores ecológicos

La frecuencia relativa (F) de cada especie endofítica fue calculada de la siguiente manera:

$$F = \frac{\text{Nº aislamientos del taxón A}}{\text{Nº total de aislamientos}} * 100$$

Se utilizó el programa EstimateS versión 8.2.0 (Colwell, 2006) para calcular las curvas de acumulación de especies de endofitos y la riqueza de endofitos estimada para cada sitio de muestreo.

La diversidad de endofitos (diversidad alfa) fue calculada a partir del índice de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1949) (H) según la siguiente fórmula:

$$H = - \sum p_i * \ln(p_i)$$

Donde:

P_i = abundancia proporcional de la especie i , es decir el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

Este índice expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección. Asume que todos los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Toma los valores $H=0$ (H mínimo) cuando solamente hay una especie y $H = \ln(S)$ (H máximo) cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos.

La similitud entre las comunidades endofíticas de cada sitio fue evaluada por medio del índice de similitud de Sørensen's (S_o) (medición de la diversidad beta) según la siguiente fórmula:

$$S_o = \frac{2 * c}{a + b}$$

Donde:

a= número de especies presentes en el sitio A,

b= número de especies presentes en el sitio B y

c= número de especies presentes en ambos sitios.

Este índice relaciona el número de especies en común con respecto a todas las especies encontradas en dos sitios, basándose en la presencia o ausencia de especies. No considera las abundancias de las especies, sino que les adjudica a todas el mismo peso (Zak & Willig, 2004).

6. Análisis multivariado

Con la finalidad de evaluar en mayor detalle la influencia de variables ambientales en la presencia y frecuencia de endofitos, se realizó un Análisis Canónico de Correspondencias (CCA) para los árboles asintomáticos muestreados y las especies de endofitos halladas, a través del programa CANOCO for Windows versión 4.5 (ter Braak & Šmilauer, 2002). Se eligió este modelo de ordenamiento luego de que los resultados iniciales con el análisis de correspondencia sin tendencia (DCA) para la diversidad beta (*gradient length*) existente indicaran que los datos (variable de respuesta) exhibían una respuesta unimodal, en vez de lineal, a los factores ambientales. Como variable de respuesta, se calculó para cada árbol asintomático muestreado la proporción de cada especie endofítica (número de aislamientos / número de fragmentos de madera).

Tres variables ambientales fueron consideradas, dos cuantitativas: diámetro a la altura del pecho (DAP) de árboles asintomáticos muestreados y porcentaje de basidiomicetes a partir de árboles sintomáticos para cada sitio de muestreo sobre el total del fragmentos de muestras de madera (%Bas) y una variable ordinal: nivel de disturbio antrópico (ND) a partir del Sitio de muestreo. Se realizó el test de Monte-Carlo para evaluar la significancia del eje 1 y de los 4 ejes de ordenamiento, con 999 permutaciones (ter Braak & Šmilauer, 2002).

7. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Un total de 25 aislamientos fueron seleccionados para la realización de estudios moleculares, 13 de ellos obtenidos como endofitos y los restantes 12 a partir de árboles sintomáticos. La mayoría de los aislamientos habían sido previamente identificados por morfología como basidiomicetes. El resto corresponde a aislamientos identificados previamente como miembros de la familia Xylariaceae (Ascomycota), los cuales pueden causar pudrición blanca en la madera. Para la realización de los estudios moleculares, los organismos fueron previamente crecidos en MEA (2%) a 24°C en oscuridad, por 2

semanas o hasta cubrir la caja y reunir suficiente micelio. Se realizó la extracción de ADN ribosomal utilizando el kit de extracción UltraClean™ Microbial DNA (Mo Bio Laboratories inc., Solana Beach, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se amplificó por PCR y secuenció la región ITS1, ARN ribosomal 5.85 e ITS2 de 19 aislamientos obtenidos en este trabajo (BAFCcult 4301-4305, 4361, 4362, 4363, 4365-4367, 4384, 4387, 4409, 4410, 4413, 4415, 4416, 4451).

Conjuntamente se amplificó la región ITS1, ARN ribosomal 5.85 e ITS2 de aislamientos obtenidos en un trabajo previo (Robles *et al.*, 2011) e identificadas como *Inonotus rickii* (BAFCcult 3300; 3304; 3305; 3307; 3308; 3316).

Las regiones ITS fueron amplificadas por medio de los primers universales ITS-1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS-4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (White *et al.*, 1990). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Boeco TC-Pro (Alemania). Para obtener los productos de amplificación se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: **(1)** 3 min a 94 °C; **(2)** 45 segundos a 94 °C (fase de desnaturalización); **(3)** 45 segundos a 57 °C (fase de *annealing*); **(4)** 1 minuto a 72 °C (fase de extensión); **(5)** 7 minutos a 72 °C (extensión final). Los pasos 2 a 4 se repitieron por 50 ciclos.

La reacción para PCR fue preparada de la siguiente manera: 1,85 µl de dNTPs 1 mM, 0,5 µl de cada primer ITS1 e ITS4 10 mM, 0,2 µl de Taq DNA polimerasa Recombinante (Invitrogen, Brasil) 1U, 1,25 µl de MgCl₂ 50 mM y 2,5 µl de buffer de reacción 10 mM suministrado por Invitrogen, 3 µl de ADN genómico de la muestra de extracción y agua ultra pura (miliQ) para llevar el volumen final de la mezcla a 26,6 µl. Cada vez que se realizó una amplificación por PCR se incluyó un control con los reactivos sin muestra de ADN. Los productos de PCR se evaluaron a través de gel de electroforesis con alícuotas de 3 µl de ADN con 3 µl de loading buffer conteniendo GelRed en un gel de agarosa 1% en 0,5X TBE (TBE 5X: 54 gr Tris; 27,5 gr Ácido bórico; 20 ml EDTA 0,5M pH 8; H₂O dd a 1000 ml). El gel fue revelado en un transiluminador de luz UV.

Se introdujeron variaciones en el protocolo de PCR cuando fue necesario:

- Utilización de primer ITS-5 en reemplazo de primer ITS-1, para los aislamientos de *I. rickii*.
- El ADN de extracción fue previamente diluido 1:10.
- La adición de 5 µl de ADN a la mezcla de PCR.

- Un volumen final de la mezcla de PCR de 50 µl: 1 µl de dNTPs 1 mM, 1 µl de cada primer 10 mM, 0,2 µl de Taq DNA Polimerasa Recombinante 1U (Invitrogen), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM y 5 µl de buffer de reacción 10 mM suministrado por el fabricante.

Adicionalmente, con el fin de evaluar más extensamente la relación entre cepas endofíticas y patógenas, se amplificó y secuenció la región de ADN que codifica para la proteína β -tubulina, para un total de 17 aislamientos: seis correspondientes a aislamientos identificados previamente como miembros de la familia Xylariaceae (Ascomycota) (BAFCcult 4384; 4409; 4410; 4413; 4416 y 4451) y los 11 restantes correspondientes a aislamientos identificados como *Inonotus rickii* (BAFCcult 3300; 3304; 3305; 3307; 3308; 3316; 4301; 4402; 4403.; 4304 y 4305).

La región del gen de β -tubulina fue amplificada por medio de los primers Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass & Donaldson, 1995). Para obtener los productos de amplificación se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: **(1)** 3 min a 95 °C; **(2)** 1 min a 94 °C (fase de desnaturalización); **(3)** 30 segundos a 58 °C (fase de *annealing*); **(4)** 1 minuto a 72 °C (fase de extensión); **(5)** 10 minutos a 72 °C (extensión final). Los pasos 2 a 4 se repitieron por 35 ciclos.

La reacción para PCR fue preparada de la siguiente manera: 1 µl de dNTPs 1 mM, 1 µl de cada primer Bt2a y Bt2b 10 mM, 0,5 µl de Taq DNA polimerasa Recombinante (Invitrogen) 1U, 1,8 µl de MgCl₂ 50 mM y 5 µl de buffer de reacción 10 mM suministrado por Invitrogen, 5 µl de ADN genómico de la muestra de extracción, previamente diluido 1:10, y agua miliQ hasta un volumen final de 50 µl. El control consistió en una mezcla de los reactivos sin muestra de ADN. Los productos de PCR fueron evaluados por gel de electroforesis como para el caso de las regiones ITS.

Los productos de todas las amplificaciones fueron purificados a través del kit de purificación MO BIO Gel (Mo bio Laboratories Inc.). La cuantificación de los productos de extracción y la de los productos purificados se realizó por medio de un fluorómetro Qbit (Invitrogen, USA) con el kit de cuantificación Qbit DNA High Sensitive. Ambas hebras de cada fragmento de ADN fueron secuenciadas por el Servicio de Secuenciación y Genotificado del Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la FCEN.

Se utilizó el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, USA) para definir la secuencia final a partir de secuencias parciales obtenidas con ambos primers. En los

casos en que se presentaron ambigüedades en los picos del cromatograma se utilizó la convención IUPAC para sustituciones nucleofílicas (Liébecq, 1992). Las secuencias finales fueron comparadas inicialmente con secuencias del GenBank a través del BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) para la búsqueda de secuencias altamente similares como un primer paso de selección de secuencias para posteriores estudios filogenéticos. Se detalla en Tablas las secuencias del GenBank que fueron comparadas con las secuencias obtenidas en este trabajo (Tabla 2 a Tabla 8). Los nombres de las especies a las que pertenecen las secuencias se mantuvieron tal como aparecen en el GenBank. No se encontraron secuencias del género *Inonotus* para el gen de la β -tubulina para comparar con las secuencias de este trabajo.

Las secuencias fueron además comparadas con las muestras ambientales (*environmental samples*) de NCBI BLAST con el fin de identificar la presencia de secuencias con alta similitud. La importancia de estas muestras ha sido señalada por autores como Hibbett *et al.* (2011) y Nilsson *et al.* (2011). Se consideraron sólo aquellas secuencias que mostraron una identidad máxima (Max Identity) y *Query coverage* mayor o igual al 97%.

Las secuencias de ADN fueron editadas y la matriz de secuencias fue construida a través del programa BioEdit sequence alignment editor versión 7.0.5.3 (Hall, 1999).

8. Análisis filogenéticos

8.1. Métodos de máxima parsimonia bajo homologías estáticas

Se utilizó el programa BioEdit para la manipulación de las matrices de secuencias y calcular el alineamiento a través del programa Clustal W Multiple alignment versión 1.4, con un número de Bootstrap de 1000. Los costos asignados fueron 10 para apertura de gaps (espacios) y 2 para extensión de gaps. Una secuencia de *Amanita muscaria* (FJ890026) fue utilizada como grupo externo (outgroup) en todos los análisis filogenéticos de ITS (máxima parsimonia bajo homologías estáticas y dinámicas e inferencia bayesiana) para todas las matrices de secuencias. Para las matrices de β -tubulina se utilizó como grupo externo otra secuencia de *Amanita muscaria* (AB095860).

Las hipótesis filogenéticas fueron construidas bajo el método de máxima parsimonia por medio del programa NONA versión 2.0 Winclada versión 1.00.08 1997-

2002 (Goloboff, 1997). Se asignó el mismo peso a todos los caracteres y los gaps fueron considerados como información pérdida. Se utilizaron como parámetros 1000 réplicas y 10000 árboles máximos. El soporte de cada clado fue calculado mediante el método de Bootstrap con los siguientes parámetros: 1000 réplicas; 100 búsquedas por replica y 1 árbol inicial por réplica.

8.2. Inferencia bayesiana bajo homologías estáticas

El análisis bayesiano se realizó a través del programa MrBayes versión 3.2. (Ronquist *et al.*, 2012). Los archivos fueron previamente preparados con el programa Mesquite 2.75 (build 5.6.4) (Maddison & Maddison, 2011). Se utilizó el programa Mega versión 5 (Tamura *et al.*, 2011) para elegir el modelo evolutivo que se ajustara mejor a cada matriz previo al análisis de inferencia bayesiana. Se descartaron el 25% de los árboles (comandos *sump* y *sumt*)

Se continuó el análisis hasta que la desviación estándar promedio de las dos cadenas (*split frequencies*) fue menor a 0,01. El análisis fue realizado 3 veces para cada matriz. En los árboles finales se consideró, para cada nodo, el valor de probabilidad más bajo de entre los 3 análisis. Se utilizó el programa Tree Figure Drawing Tool - FigTree versión 1.3.1 (Rambaut, 2009) para visualizar y editar los árboles resultantes.

8.3. Análisis bajo homologías dinámicas

El análisis se llevó a cabo mediante el uso del programa POY versión 4.0.2467 Beta (Wheeler *et al.*, 2006). El análisis fue realizado a través de la consola de comandos. Se le asignó el mismo peso a todos los caracteres y se utilizaron los siguientes parámetros: *auto_sequence_partition*; *build* (10); *swap* (100). Dos costos diferentes fueron considerados:

- a) 1; 1; 10 (sustituciones, indels (inserciones, deleciones), apertura de gap)
- b) 1; 2; 10.

El soporte de cada clado se calculó por medio del soporte de Bremer a través del comando *calculate_support (bremer)*.

Especie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Daldinia childiae</i>	HM192905	República Checa	<i>Quercus robur</i> L.	Pazoutova <i>et al.</i> (2010)
<i>Daldinia childiae</i>	AM292043	República Checa	<i>Quercus robur</i> L.	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia caldariorum</i>	AM749934	Francia	<i>Ulex europaeus</i> L.	Bitzer <i>et al.</i> (2008)
<i>Daldinia caldariorum</i>	EF026144	Taiwán	---	Hsieh <i>et al.</i> (2010)
<i>Daldinia clavata</i>	AM749931	Argentina	---	Bitzer <i>et al.</i> (2008)
<i>Daldinia concentrica</i>	AF176958	Reino Unido	<i>Fraxinus Tourn Ex</i> L.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia concentrica</i>	FN539036	---	---	Parfitt <i>et al.</i> (2010)
<i>Daldinia concentrica</i>	AM292045	República Checa	<i>Tilia</i> L.	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia concentrica</i>	AM292046	Reino Unido	<i>Quercus robur</i> L.	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia decipiens</i>	HM192910	República Checa	<i>Alnus glutinosa</i> L. Gaertn	Pazoutova <i>et al.</i> (2010)
<i>Daldinia decipiens</i>	AM292039	República Checa	<i>Quercus robur</i> L.	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia eschscholzii</i>	AB284189	Tailandia	<i>Samanea saman</i> (Jacq.) Merr.	Karnchanatat <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia eschscholzii</i>	GU199418	Australia	<i>Adansonia gregorii</i> F. Muell.	Sakalidis <i>et al.</i> (2011)
<i>Daldinia fissa</i>	EF026146	Alemania	---	Hsieh <i>et al.</i> (2010)
<i>Daldinia fissa</i>	AF176981	Dinamarca	<i>Malus</i> Mill.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia fissa</i>	AM292038	República Checa	árbol de hoja ancha	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia grandis</i>	AM749918	Perú	---	Bitzer <i>et al.</i> (2008)
<i>Daldinia grandis</i>	AF176982	Reino Unido	<i>Fagus</i> L.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia loculata</i>	EF026145	Reino Unido	---	Hsieh <i>et al.</i> (2010)
<i>Daldinia loculata</i>	AF176959	Letonia	<i>Betula</i> L.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia loculata</i>	AF176964	Rusia	<i>Betula</i> L.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia loculata</i>	AF176969	Suecia	<i>Sorbus</i> L.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia petriniae</i>	AF176975	Suecia	<i>Alnus</i> Mill.	Johannesson <i>et al.</i> (2000)
<i>Daldinia pyrenaica</i>	AM749927	España	---	Bitzer <i>et al.</i> (2008)
<i>Daldinia vernicosa</i>	AF163022	EE.UU.	---	Lee <i>et al.</i> (2000)
<i>Hypoxylon cinnabarinum</i>	JN979409	Puerto Rico	rama	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon erythrostroma</i>	JN979415	México	madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon fuscum</i>	AY616702	---	<i>Alnus</i> Mill.	Triebel <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon haematostroma</i>	JN979426	Taiwán	madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon lividipigmentum</i>	JN979433	México	madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon macrocarpum</i>	AY616704	---	<i>Corylus avellana</i> L.	Triebel <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon macrosporum</i>	JN979434	Canadá	<i>Populus</i> L.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon monticulosum</i>	JN979435	Taiwán	corteza	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxylon rubiginosum</i>	EF026143	Reino Unido	---	Hsieh <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypoxylon shearii</i> var. <i>minor</i>	EF026142	México	---	Hsieh <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypoxylon submonticulosum</i>	JQ009316	Francia	<i>Ulmus</i> sp.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)

Tabla 2: Secuencias de especies de *Daldinia* e *Hypoxylon* para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.

Especie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Daldinia bambusicola</i>	AY951688	Tailandia	Sobre bambú	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia caldariorum</i>	AY951689	México	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia caldariorum</i>	AY951690	Taiwán	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia childiae</i>	AY951691	EE.UU.	<i>Acacia koa</i> A. Gray	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia childiae</i>	AY951692	Taiwán	<i>Alnus formosana</i> Mak.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia clavata</i>	AY951693	México	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia concentrica</i>	FJ185285	Papúa Nueva Guinea		Platas <i>et al.</i> (2009)
<i>Daldinia decipiens</i>	AY951694	Dinamarca	<i>Betula pendula</i> Roth.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia decipiens</i>	AM292036	Rep. Checa	<i>Xiphidria longicollis</i>	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia decipiens</i>	AM292037	Rep. Checa	<i>Xiphidria camelus</i>	Srutka <i>et al.</i> (2007)
<i>Daldinia eschscholtzii</i>	AY951695	Guadalupe	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia eschscholtzii</i>	AY951696	Taiwán	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia fissa</i>	AY951697	Alemania	<i>Fagus sylvatica</i> L.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia loculata</i>	AY951698	Inglaterra	<i>Fagus</i> L.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia petriniae</i>	AY951699	EE.UU.	<i>Betula nigra</i> L.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Daldinia singularis</i>	AY951700	Rusia	<i>Carpinus cordata</i> Blume	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton brevisporum</i>	AY951705	Puerto Rico	Sobre árbol caído	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton placentiforme</i>	AY951745	México	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton placentiforme</i>	AY951746	México	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton rubiginosum</i>	AY951751	Gales	<i>Fraxinus Tourn Ex. L</i>	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton subgilvum</i>	AY951755	Taiwán	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton submonticulosum</i>	AY951756	Francia	<i>Ulmus</i> L.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton ticinense</i>	AY951757	Francia	<i>Fraxinus Tourn Ex. L</i>	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton trugodes</i>	AY951759	Taiwán	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton ulmophilum</i>	AY951760	Rusia	<i>Ulmus japonica</i> (Rehder) Sarg.	Hsieh <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypoxyton vinosopulvinatum</i>	AY951761	Taiwán	Sobre madera	Hsieh <i>et al.</i> (2005)

Tabla 3: Secuencias de especies de *Daldinia* e *Hypoxyton* para la región codificante de la β -tubulina. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.

Especie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Coprinellus curtus</i>	AY461834	Hawái	---	Keirle <i>et al.</i> (2004)
<i>Coprinellus curtus</i>	FM878016	---	---	Nagy <i>et al.</i> (2010)
<i>Coprinellus micaceus</i>	AY461832	Hawái	---	Keirle <i>et al.</i> (2004)
<i>Coprinellus micaceus</i>	JN943116	Hungría	---	Nagy (2011) *
<i>Coprinellus micaceus</i>	EU551214	Australia	<i>Phascolarctos cinereus</i> Goldfuss	Peterson <i>et al.</i> (2009)
<i>Coprinellus micaceus</i>	FJ850968	Argentina	<i>Platanus acerifolia</i> (Ait.) Willd.	Robles <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinellus micaceus</i>	FJ850969	Argentina	<i>Platanus acerifolia</i> (Ait.) Willd	Robles <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinellus micaceus</i>	FJ850970	Argentina	<i>Platanus acerifolia</i> (Ait.) Willd	Robles <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinellus micaceus</i>	FJ850971	Argentina	<i>Platanus acerifolia</i> (Ait.) Willd	Robles <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinellus micaceus</i>	FJ168568	USA	---	Slot <i>et al.</i> (2010)
<i>Coprinopsis atramentaria</i>	DQ486694	---	---	Matheny <i>et al.</i> (2006)
<i>Coprinopsis atramentaria</i>	FN396110	---	---	Nagy <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	AY461825	Hawái	---	Keirle <i>et al.</i> (2004)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	JN943122	Hungría	---	Nagy (2011) *
<i>Coprinopsis cinerea</i>	JN943128	Hungría	---	Nagy (2011) *
<i>Coprinopsis cinerea</i>	EU168109	---	---	Naumann <i>et al.</i> (2007)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	FJ904826	Kenia	<i>Grevillea robusta</i> A. Cunn. ex R. Br.	Njuguna <i>et al.</i> (2009)*
<i>Coprinopsis cinerea</i>	GQ131575	---	Humano	Suarez <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	HQ433353	---	Humano	Suarez <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	GU327634	---	---	Suh & Zhou (2009) *
<i>Coprinopsis cinerea</i>	AB097562	---	---	Suzuki <i>et al.</i> (2003)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	FJ713066	---	Humano	Thornton (2009)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	FJ713078	---	Humano	Thornton (2009)
<i>Coprinopsis echinospora</i>	AB071798	Japón	---	Suzuki <i>et al.</i> (2002)
<i>Coprinopsis echinospora</i>	AB071802	Países Bajos	---	Suzuki <i>et al.</i> (2002)
<i>Coprinopsis phlyctidospora</i>	AB071608	Japón	---	Suzuki <i>et al.</i> (2002)
<i>Coprinopsis phlyctidospora</i>	AB071609	Países Bajos	---	Suzuki <i>et al.</i> (2002)
<i>Coprinopsis picacea</i>	JN943110	Hungría	---	Nagy (2011) *
<i>Coprinopsis picacea</i>	FN396119	---	---	Nagy <i>et al.</i> (2011)
<i>Coprinopsis radiata</i>	JN943119	Hungría	---	Nagy (2011) *
<i>Coprinopsis radiata</i>	JN943123	Hungría	---	Nagy (2011) *
<i>Coprinopsis radiata</i>	HQ847024	---	---	Nagy <i>et al.</i> (2011) *
<i>Coprinopsis stercorea</i>	AY461828	Hawái	---	Keirle <i>et al.</i> (2004)
<i>Coprinopsis stercorea</i>	FM878028	---	---	Nagy <i>et al.</i> (2011)

Tabla 4: Secuencias de especies de *Coprinellus* y *Coprinopsis* para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes. *: Trabajo no publicado.

Especie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Campanophyllum proboscideum</i>	AY230866	México	---	Cifuentes <i>et al.</i> (2003)
<i>Campanophyllum proboscideum</i>	AY230867	México	---	Cifuentes <i>et al.</i> (2003)
<i>Cheimonophyllum candidissimum</i>	DQ486687	---	---	Matheny <i>et al.</i> (2006)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	GU062264	Letonia	<i>Alnus incana</i> L. Moench	Arhipova <i>et al.</i> (2011)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	JF340265	Letonia	<i>Alnus glutinosa</i> L. Gaertn	Arhipova <i>et al.</i> (2011)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	GU198359	Chile	<i>Vaccinium</i> L.	France <i>et al.</i> (2009)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	GQ411519	Nueva Zelanda	<i>Nothofagus solandri</i> Oerst	Fukami <i>et al.</i> (2010)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	DQ200929	---	---	Matheny <i>et al.</i> (2007)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	EF155489	---	---	Volkenant (2007)
<i>Cyphella digitalis</i>	DQ486698	---	---	Matheny <i>et al.</i> (2006)
<i>Granulobasidium vellereum</i>	DQ205683	---	---	Matheny & Hibbet (2005)*
<i>Hypochnicium bombycinum</i>	FN552537	España Rep.	<i>Quercus petraea</i> Matt. Liebl.	Telleria <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypochnicium cystidiatum</i>	DQ658163	Centroafricana	<i>Bambusa</i> Schreb.	Paulus <i>et al.</i> (2007)
<i>Hypochnicium geogenium</i>	AF429426	Suecia	madera de conífera	Nilsson & Hallenberg (2003)
<i>Hypochnicium geogenium</i>	FN552534	Francia	<i>Abies alba</i>	Telleria <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypochnicium guineensis</i>	FN552536	Guinea	basidioma no identificado	Telleria <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypochnicium lundellii</i>	AY781277	Suecia	<i>Picea abies</i> (L.)H. Karst	Vasiliauskas <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypochnicium michelii</i>	FN552535	España	<i>Pinus nigra</i> J.F. Arnold	Telleria <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypochnicium punctulatum</i>	AF429414	Dinamarca	<i>Pinus nigra</i> J.F. Arnold	Nilsson & Hallenberg (2003)
<i>Hypochnicium subrigescens</i>	JN710546	Noruega	---	Miettinen <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypochnicium subrigescens</i>	AF429427	Dinamarca	<i>Betula</i> L.	Nilsson & Hallenberg (2003)
<i>Hypochnicium vellereum</i>	HE586734	Uganda	---	Rossmann <i>et al.</i> (2012)
<i>Hypochnicium vellereum</i>	AY787674	Lituania	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Lygis <i>et al.</i> (2005)
<i>Hypochnicium wakefieldiae</i>	FN552532	Portugal	<i>Eucalyptus</i> L'Hér	Telleria <i>et al.</i> (2010)

Tabla 5: Secuencias de especies de *Campanophyllum*, *Cheimonophyllum*, *Chondrostereum*, *Cyphella*, *Granulobasidium* e *Hypochnicium* para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes. *: Trabajo no publicado.

Especie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Hymenochaete acerosa</i>	JQ279543	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete adusta</i>	JQ279523	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete anomala</i>	JQ279566	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete cinnamomea</i>	JQ279548	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete corrugata</i>	JN230420	Reino Unido	<i>Corylus avellana</i> L.	Grundy <i>et al.</i> (2012)
<i>Hymenochaete corrugata</i>	JN230422	Irlanda	<i>Corylus avellana</i> L.	Grundy <i>et al.</i> (2012)
<i>Hymenochaete corrugata</i>	JQ279607	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete cruenta</i>	JQ279596	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete denticulata</i>	AY558595	China	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Hymenochaete epichlora</i>	JQ279550	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete floridea</i>	JQ279598	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete fulva</i>	JQ279564	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete innexa</i>	JQ279584	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete intricata</i>	JQ279609	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete lenta</i>	JQ279616	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete longispora</i>	JQ279537	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete luteobadia</i>	JQ279568	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete megaspora</i>	JQ279554	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete minuscula</i>	JQ279546	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete murina</i>	JQ279602	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete muroiana</i>	JQ279541	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete nanospora</i>	JQ279531	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete ochromarginata</i>	JQ279578	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete rigidula</i>	JQ279612	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete rhabarbarina</i>	JQ279574	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete rubiginosa</i>	JQ279580	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete senatoumbrina</i>	JQ279540	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete separabilis</i>	JQ279572	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete spathulata</i>	JQ279592	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete sphaericola</i>	JQ279600	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete sphaerospora</i>	JQ279594	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete sprete</i>	AY558597	Canadá	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Hymenochaete tasmanica</i>	JQ279582	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete tenuis</i>	JQ279539	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete unicolor</i>	JQ279552	China	---	He & Dai (2012)
<i>Hymenochaete yasudai</i>	JQ279614	China	---	He & Dai (2012)
<i>Pseudochaete tabacina</i>	JQ279610	China	---	He & Dai (2012)
<i>Pseudochaete tabacina</i>	JQ279611	China	---	He & Dai (2012)
<i>Pseudochaete tabacina</i>	AY558598	---	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)

Tabla 6: Secuencias de especies de *Hymenochaete* y *Pseudochaete* para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.

Espe cie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Inocutis jamaicensis</i>	AY072029	Argentina	<i>Lomatia hirsuta</i> (L.) Diels ex Macbr.	Gottlieb <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus alpinus</i>	JQ860312	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)
<i>Inonotus andersonii</i>	AY558599	Corea	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Inonotus baumii</i>	JQ860307	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)
<i>Inonotus baumii</i>	JX069836	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)
<i>Inonotus circinatus</i>	AF237728	---	---	Hamelin <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus cuticularis</i>	AF237730	---	---	Hamelin <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus glomeratus</i>	AF247968	---	---	Hamelin <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus hispidus</i>	GU068592	Italia	<i>Sofora japonica</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus hispidus</i>	AM269784	EE.UU.	<i>Quercus phellos</i> L.	Guglielmo <i>et al.</i> (2007)
<i>Inonotus hispidus</i>	AY558602	Reino Unido	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Inonotus lonicericola</i>	JQ860308	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)
<i>Inonotus micantissimus</i>	JF692194	EE.UU.	<i>Ocotea coriacea</i> (S.) Britton	Vlasák <i>et al.</i> (2012)
<i>Inonotus obliquus</i>	AY558593	---	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Inonotus patouillardii</i>	AY072024	Argentina	---	Gottlieb <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus patouillardii</i>	AY072028	Argentina	---	Gottlieb <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus porrectus</i>	AY558603	EE.UU.	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Inonotus quercustris</i>	AY072026	Argentina	<i>Schinus</i> L.	Gottlieb <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus rickii</i>	FJ667753	China	<i>Hevea brasiliensis</i> (Müll.) Arg.	Dai <i>et al.</i> (2010)
<i>Inonotus rickii</i>	GU111921	Italia	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	GU111922	Italia	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	GU111923	EE.UU.	<i>Myrica cerifera</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	GU111924	EE.UU.	<i>Myrica cerifera</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362900	Italia	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362901	Italia	<i>Sambucus nigra</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362902	España	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362904	España	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362905	España	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362906	Grecia	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362907	EE.UU.	<i>Myrica cerifera</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362908	Italia	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	HM362909	Italia	<i>Acer negundo</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus rickii</i>	AY072025	Argentina	<i>Casuarina cunninghamiana</i> Miq.	Gottlieb <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus rickii</i>	AY072027	Argentina	<i>Acacia melanoxylon</i> R. Br.	Gottlieb <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus rickii</i>	GU016326	Argentina	<i>Platanus acerifolia</i> Ait. (Willd.)	Robles <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus sanghuang</i>	JQ860316	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)
<i>Inonotus tamaricis</i>	GU111920	Italia	<i>Tamarix gallica</i> L.	De Simone <i>et al.</i> (2011)
<i>Inonotus tamaricis</i>	AY558604	Turkmenistán	---	Jeong <i>et al.</i> (2005)
<i>Inonotus tenuicontextus</i>	JN169786	China	---	Zhou & Qin (2012)
<i>Inonotus tomentosus</i>	AF237729	---	---	Hamelin <i>et al.</i> (2002)
<i>Inonotus tricolor</i>	JN169787	---	---	Zhou & Qin (2012)
<i>Inonotus vaninii</i>	JN642592	---	---	Wu <i>et al.</i> (2012)
<i>Inonotus vaninii</i>	JN169788	---	---	Zhou & Qin (2012)

<i>Inonotus weigela</i>	JQ860320	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)
<i>Inonotus zonatus</i>	JX069837	---	---	Tian <i>et al.</i> (2013)

Tabla 7: Secuencias de especies de *Inocutis* e *Inonotus* para la región ITS1/ITS2. Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.

Especie	Acceso al GenBank	Origen geográfico	Hospedante	Referencia
<i>Phanerochaete allantospora</i>	AY219357	EE.UU.	<i>Fouquieria splendens</i> Engelm. <i>Cercocarpus breviflorus</i> A.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete arizonica</i>	AY219350	EE.UU.	Gray	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete australis</i>	AY219371	EE.UU.	sobre madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete australis</i>	AY219372	EE.UU.	<i>Psidium</i> (guayaba)	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete australis</i>	AY219373	Puerto Rico	corteza de madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete australis</i>	AY219374	Puerto Rico	rama de madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete avellanea</i>	AY219355	EE.UU.	sobre madera dura caída	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete burtii</i>	AY219352	EE.UU.	sobre madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete carnosa</i>	AY219354	EE.UU.	<i>Abies balsamea</i> L. Mill.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete chrysorhiza</i>	AY219359	EE.UU.	sobre madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	AY219344	Rusia	<i>Vitis</i> L.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	JN882305	---	---	Houseknecht <i>et al.</i> (2011)*
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HQ188432	EE.UU.	---	James <i>et al.</i> (2011)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HQ188434	EE.UU.	---	James <i>et al.</i> (2011)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HQ188435	EE.UU.	---	James <i>et al.</i> (2011)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HQ188437	EE.UU.	---	James <i>et al.</i> (2011)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	GU966518	---	---	Liang & Li (2010) *
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	AF475146	---	---	Lim <i>et al.</i> (2007)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	AF475147	---	---	Lim <i>et al.</i> (2007)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	JQ796876	---	---	Zhang & Li (2012)*
<i>Phanerochaete ericina</i>	AY219345	EE.UU.	Sobre madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete flava</i>	AY219358	Puerto Rico	---	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete hiulca</i>	AY219342	EE.UU.	<i>Quercus</i> sp.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete laevis</i>	AY219347	EE.UU.	<i>Pinus</i> L.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete laevis</i>	AY219348	EE.UU.	sobre madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete magnoliae</i>	AY219343	EE.UU.	<i>Quercus</i> sp.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete rimosa</i>	AY219349	EE.UU.	<i>Populus deltoides</i>	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete sanguinea</i>	AY219353	EE.UU.	<i>Quercus</i> sp.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete sordida</i>	FJ228210	Suecia	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Bakys <i>et al.</i> (2009)
<i>Phanerochaete sordida</i>	AB210078	---	---	Kamei <i>et al.</i> (2005)
<i>Phanerochaete sordida</i>	AF475148	---	---	Lim <i>et al.</i> (2007)
<i>Phanerochaete sordida</i>	AF475150	---	---	Lim <i>et al.</i> (2007)
<i>Phanerochaete sordida</i>	AF475151	---	---	Lim <i>et al.</i> (2007)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HQ248216	Colombia	palma aceitera (<i>Elaeis</i>) nido de la hormiga <i>Cyphomyrme wheeleri</i> Forel	Navia <i>et al.</i> (2010)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HQ608013	EE.UU.		Rodrigues <i>et al.</i> (2011)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HM751803	China	<i>Bletilla ochracea</i> Schltr.	Tao <i>et al.</i> (2012)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HM997134	Brasil	<i>Solanum cernuum</i> Vell.	Vieira <i>et al.</i> (2012)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HM595562	China	<i>Abies beshanzuensis</i> M.H. Wu	Yuan <i>et al.</i> (2011)
<i>Phanerochaete subceracea</i>	AY219346	EE.UU.	<i>Quercus</i> sp.	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete tuberculata</i>	AY219356	EE.UU.	<i>Populus deltoides</i> Marsh	de Koker <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete velutina</i>	AY219351	EE.UU.	sobre madera dura	de Koker <i>et al.</i> (2003)

Tabla 8: Secuencias de especies de *Phanerochaete* para la región ITS1/ITS2. Números de de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.

9. Estudios de producción de oxidasas

Los estudios de producción de oxidasas se realizaron sobre cepas de basidiomicetes y de *Nodulisporium*, en aislamientos seleccionados para cada especie. Se realizaron estudios en medios de cultivo especiales para determinar la producción de oxidasas extracelulares por medio de ácido gálico y ácido tánico (Davidson *et al.*, 1938), guayacol (0.2 %) (Nobles, 1958), p-cresol y medio con tirosina 0,2% (Boidin, 1951). Se registró la presencia de zona de difusión alrededor del inóculo y su intensidad relativa, luego de una semana de incubación en cajas de Petri de 9 cm de diámetro a 24°C en oscuridad. La presencia de halo de coloración, reacción positiva, y su intensidad se indicó con signos +, y la ausencia de zona de difusión, considerada reacción negativa, se indicó con el signo -. Estos estudios se realizaron además sobre especies de ascomicetes potencialmente degradadores (pertenecientes a la familia Xylariaceae).

10. Ensayos de degradación *in vitro*

Se analizó la capacidad degradadora de las siguientes especies de basidiomicetes aislados de la madera de plátanos: *Coprinopsis cinerea* (Schaeff.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo (BAFCcult 4361), *Granulobasidium vellereum* (Ellis & Cragin) Jülich (BAFCcult 4362), *Hymenochaete* sp. (BAFCcult 4387), *Inonotus rickii* (Pat.) D.A. Reid endofítico (BAFCcult 4302) y *Phanerochaete chrysosporium* Burds. (BAFCcult 4415). Además se incluyó en los estudios una cepa endofítica y una no endofítica de *Nodulisporium* sp. (Xylariaceae) (BAFCcult 4416 y BAFCcult 4385, respectivamente), el cual constituye un anamorfo de especies potenciales causantes de pudrición blanca. Para esto se estimó la pérdida de peso seco de probetas de madera (albura y duramen) de rama sana de un único individuo de *P. acerifolia* (Robles *et al.*, 2011).

Se determinó el peso inicial de probetas de 1 x 3 x 0,5 cm aprox., por medio de una balanza analítica Explorer Ohaus, de la siguiente forma: las probetas fueron colocadas en estufa a 60°C por 72 horas y luego mantenidas a 30°C hasta obtener tres medidas consecutivas de peso con una variación menor a 0,02 gr. El promedio de estas tres medidas fue considerado como peso inicial. Las probetas fueron luego hidratadas durante 48 horas con agua destilada para finalmente ser esterilizadas por medio de autoclave a 1,1 atm por 20 minutos. Tubos de 19 x 2 cm con medio de Nobles 1,25% (Difco Lab.) en pico de flauta fueron inoculados bajo flujo laminar con discos de 5 mm

diam en Nobles 1,25% de las cepas arriba mencionadas. Una vez cubierta con micelio la superficie del tubo, se incorporaron las probetas estériles. Luego de tres meses en oscuridad a 24°C, las probetas fueron retiradas y limpiadas superficialmente. Probetas sin inocular se utilizaron como control. Se realizaron 20 réplicas por tratamiento. Las probetas retiradas fueron secadas en estufa y pesadas siguiendo el mismo procedimiento que al inicio del estudio.

La pérdida de peso seco para cada probeta fue determinada de acuerdo con Mielnichuk & Lopez (2007):

$$\text{Peso seco perdido (\%)} = \frac{\text{peso seco inicial} - \text{peso seco final}}{\text{peso seco inicial}} * 100$$

El peso seco perdido de todas las réplicas fue promediado para obtener un único valor por tratamiento.

11. Control biológico

11.1. Ensayos de confrontación en cultivos duales

Se realizaron enfrentamientos en cajas de Petri de 9 cm diámetro con MEA 2%. Los hongos xilófagos utilizados fueron: *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. (BAFCcult 3301), *Ganoderma resinaceum* Boud. (BAFCcult 3297), *Inonotus rickii* (BAFCcult 3300) y *Trametes trogii* Berk. (BAFCcult 3317). Estas cepas habían sido aisladas de madera de plátanos de la Ciudad de Buenos Aires en un trabajo previo (Robles *et al.*, 2011). En este trabajo además se obtuvo que *Inonotus rickii* fue la especie más frecuentemente registrada y que los restantes tres agentes xilófagos causaron la mayor pérdida de peso de madera de plátano en ensayos *in vitro*.

Los hongos evaluados como posibles antagonistas fueron aislados de madera de plátano:

-Tres especies de micromicetes saprófitos: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (BAFCcult 4359), *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries (BAFCcult 4360) y *Trichoderma harzianum* Rifai (BAFCcult 4368). Estas especies fueron las más abundantes entre los saprófitos obtenidos.

-Tres especies de micromicetes endofíticos: *A. alternata* (BAFCcult 4325), *C. cladosporioides* (BAFCcult 4334) y *T. harzianum* (BAFCcult 4414). Estas especies fueron las más abundantes entre los endofitos obtenidos.

-Tres especies de basidiomicetes encontrados como endofitos en madera de plátanos durante este trabajo: *Coprinopsis cinerea* (Schaeff.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo (BAFCcult 4361), *Granulobasidium vellereum* (Ellis & Cragin) Jülich (BAFCcult 4363) y *Trichosporon sporotrichoides* (Oorschot) Oorschot & de Hoog (BAFCcult 4408).

Para los enfrentamientos se realizaron los siguientes tratamientos: cada uno de los 4 hongos xilófagos fue enfrentado con los 9 potenciales antagonistas. En un set de enfrentamientos se colocó sobre la superficie del agar un inóculo de 0,5 x 0,5 cm del antagonista en un extremo de la caja y luego de 5-6 días, se colocó un inóculo del mismo tamaño del xilófago en el extremo opuesto de la caja (**1° Antagonista**). En otro set de enfrentamientos, con idéntico tamaño y ubicación de los inóculos, se inoculó primero el xilófago y, a los 5-6 días, el antagonista (**1° Xilófago**). En el caso de *Trichoderma harzianum*, debido a su rápido crecimiento, el xilófago se agregó luego de 3 días. Los controles consistieron en cajas solamente con el xilófago y solamente con el antagonista. Se realizaron 5 réplicas de cada combinación. Los cultivos permanecieron a 24°C en oscuridad y fueron evaluados cada 2-4 días durante 1 mes. Los diámetros de las colonias de los xilófagos fueron medidos y comparados luego con los diámetros de las colonias control del xilófago. Se realizaron observaciones bajo microscopio óptico en busca de posibles interacciones hifales.

Se calculó la inhibición de crecimiento (IC) de la colonia causada por cada potencial antagonista sobre cada uno de los 4 basidiomicetes xilófagos luego de 1 mes de ensayo (Jayasinghe & Parkinson, 2008):

$$IC = \frac{\text{radio de colonia control (cm)} - \text{radio de colonia en cultivo dual (cm)}}{\text{radio de colonia control (cm)}} * 100$$

Las interacciones fueron clasificadas como:

++ = Crecimiento del antagonista sobre el xilófago (sobrecrecimiento del antagonista).

+ = Alteración del crecimiento normal del xilófago, sin sobrecrecimiento entre las colonias.

- = No hay control. Crecimiento del xilófago por encima del antagonista (sobrecrecimiento del xilófago).

++ / - = Algunas réplicas exhiben un crecimiento del xilófago sobre el antagonista y otras muestran un crecimiento del antagonista sobre el xilófago.

(1) = Sobrecrecimiento del xilófago sobre al antagonista, aunque más lentamente que (-)

11.2. Ensayos de confrontación *in vitro* sobre probetas de madera de plátano

Con la finalidad de evaluar más profundamente la capacidad antagonista de *G. vellereum* se realizaron ensayos de confrontación *in vitro* sobre probetas de madera sana de plátano (1 x 3 x 0,5 cm aprox.). Las probetas fueron secadas, pesadas y esterilizadas de acuerdo a lo descrito en la sección: “Ensayos *in vitro* de pérdida de peso”.

Los hongos involucrados en este estudio fueron los siguientes:

Biocontrolador- antagonista: *Granulobasidium vellereum* (BAFCcult 4363)

Hongos xilófagos:

Bjerkandera adusta (BAFCcult 3301)

Ganoderma resinaceum (BAFCcult 3297)

Inonotus rickii (BAFCcult 3300)

Trametes trogii (BAFCcult 3317)

Se realizaron los siguientes tratamientos de cultivos duales: en tubos de 19 x 2 cm en pico de flauta con medio de Nobles (1,25%) fueron introducidos inóculos de alrededor de 5 mm diam. de alguno de los cuatro xilófagos involucrados o bien del antagonista *G. vellereum*, para luego ser incubados en oscuridad a 24°C. Una vez cubierta con micelio la superficie del tubo, se incorporaron las probetas estériles. Luego de 6 días de introducidas las probetas, se inoculó el segundo hongo, colocando un inóculo de 5 mm diam. sobre la probeta de madera ya colonizada por el primer hongo. Cada tratamiento contó con 17 réplicas. Probetas sin inocular se utilizaron como control.

Los 8 tratamientos resultantes fueron los siguientes:

1° *G. vellereum* – 2° *B. adusta*

1° *G. vellereum* – 2° *G. resinaceum*

1° *G. vellereum* – 2° *I. rickii*

1° *G. vellereum* – 2° *T. trogii*

1° *B. adusta* – 2° *G. vellereum*

1° *G. resinaceum* – 2° *G. vellereum*

1° *I. rickii* – 2° *G. vellereum*

1° *T. trogii* – 2° *G. vellereum*

Luego de 3 meses de incubación a 24°C, en oscuridad, las probetas fueron retiradas de los tubos, limpiadas superficialmente, secadas y pesadas nuevamente, determinándose el peso final de manera similar al peso inicial.

El peso inicial y final permitió calcular la pérdida de peso causada por la degradación, de la forma anteriormente mencionada (Mielnichuk & Lopez, 2007).

12. Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATISTICA for Windows (Statsoft Inc., 1999) para los análisis estadísticos.

Los valores DAP, utilizados como indicadores de la edad relativa de los árboles, fueron contrastados por medio de un test Chi-cuadrado (χ^2) contra los basidiomicetes aislados de árboles sintomáticos.

Se aplicó la prueba estadística paramétrica de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para los valores de degradación (pérdida de peso seco) de todas las cepas evaluadas (Sokal & Rohlf, 1995). Adicionalmente se comparó por esta vía las diferencias entre los valores de degradación obtenidos por el tratamiento con *Inonotus rickii* endofítico y los obtenidos por la cepa de *I. rickii* aislada previamente de plátanos sintomáticos en la Ciudad (Robles *et al.*, 2011).

Las variaciones en la pérdida de peso seco en los ensayos de control biológico fueron analizadas estadísticamente por un diseño factorial de ANOVA de dos factores. Los dos factores considerados fueron las cepas (factor con 5 niveles: las cuatro especies de xilófagos y el control sin inocular) y el tratamiento con el antagonista (factor con 3 niveles: ausencia de antagonista, presencia de antagonista inoculado en primer lugar, presencia de antagonista inoculado en segundo lugar). Se realizó la prueba de efectos simples en caso de que la interacción entre los factores resultara significativa. Las medias de todos los tratamientos se analizaron por contrastes (Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey). En ambos análisis los datos fueron transformados según $y =$

y^{1/2} para el cumplimiento de los supuestos de ANOVA. Se estableció como nivel de significancia a $p < 0,01$.

13. Estudios histológicos

Se realizaron estudios histológicos sobre madera de rama sana de plátano (probetas de 1 x 3 x 0,5 cm) sometidas en ensayos *in vitro* a la acción de *Bjerkandera adusta* (BAFCcult 3301) e *Inonotus rickii* (BAFCcult 3300) según la metodología indicada en Robles *et al.* (2011), en el cual se señaló la importancia de estos hongos xilófagos.

Se obtuvieron cortes transversales (CT), longitudinales tangenciales (CLT) y longitudinales radiales (CLR) de alrededor de 10-12 μm de grosor de las probetas tratadas y las probetas control. Se utilizó un micrótomo Leica (SM2000R, Nussloch, Alemania) para la realización de los cortes. Estos se mantuvieron en etanol 50% con glicerina.

13.1. Microscopía óptica

Para la realización de los estudios bajo microscopía óptica algunos cortes fueron teñidos con la coloración sucesiva doble de safranina-fast green (Gurr BDH Chemicals, Inglaterra), deshidratados en una serie de etanol (70% (v/v), 96% (v/v), 100% (v/v), 100% (v/v), 1-2 min cada uno) y xileno (Berna, Argentina) y montados en bálsamo sintético (PMYR, Instrumental Pasteur, Argentina). La coloración de safranina-fast green se utiliza como un indicador cualitativo de la distribución de la lignina. La safranina tiñe de rojo la lignina presente en la pared celular mientras que el fast-green tiñe de azul la celulosa presente (Putoczky *et al.*, 2007).

Con la finalidad de detectar tejidos lignificados, algunos cortes fueron tratados con fluoroglucinol 1% (w/v) (Sigma Chemical, EE.UU.) y HCl 25% (v/v) (Anedra S.A., Argentina). A través de este test se observa una coloración roja o rosada en los elementos de la pared celular según el proceso de lignificación sea más o menos intenso, respectivamente (Ohlde *et al.*, 1992). Los cortes fueron tratados adicionalmente con rojo de rutenio 0,01% (w/v) (Sigma Chemical, EE.UU.) para detectar pectinas (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Las sustancias pépticas toman un color rosado a rojo con este colorante. Se evaluó además la autofluorescencia de lignina y las propiedades anisotrópicas de la celulosa fueron analizadas bajo luz polarizada.

Finalmente cortes transversales ultrafinos (1 μm de grosor) en portaobjetos fueron teñidos con 0,05% (w/v) azul de toluidina (Merck Química Argentina S.A., Argentina) en una solución de 2,5% (w/v) Na_2CO_3 (pH 11,1) a 60 °C por 1–6 min.

Las observaciones de microscopía óptica (MO) fueron hechas a través de un microscopio de epifluorescencia (UV) Zeiss Axioskop (Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Olympus C-5060 Wide Zoom (Tokio, Japón) y un microscopio Leica DM 2500 (Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara digital Leica EC3 (Heerbrugg, Suiza).

13.2. Microscopía electrónica

Se realizaron observaciones de los cortes bajo microscopio electrónico de barrido (MEB) y microscopio electrónico de transmisión (MET) en el Centro de Microscopías Avanzadas (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

13.2.1. Microscopía electrónica de barrido

Para las observaciones con MEB los cortes (de alrededor de 12 μm de grosor) fueron deshidratados y examinados en un microscopio electrónico de barrido Zeiss SUPRA TM 40 (Oberkochen, Alemania)

13.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Se cortaron piezas de alrededor de 1 mm^3 de probetas tratadas y probetas control con un bisturí y se fijaron en glutaraldehído 3% (v/v) en 20 mM de buffer fosfato Na_2HPO_4 – Na_2HPO_4 (pH 7,4), a 4°C durante 12 h. Luego fueron lavadas con el buffer durante 24 horas y vueltas a fijar en solución acuosa de OsO_4 acuoso 1 % (p/v) a 20°C durante 2 horas. Las muestras fueron posteriormente lavadas con el mismo buffer durante 1 hora, deshidratadas a través de una serie ascendente de etanol (50% (v/v), 70% (v/v), 90% (v/v), 100% (v/v), 15 min cada uno) y de etanol-acetona (2:1, 2:2, 1:3; acetona pura, 15 min cada una) a 20°C, y embebidas en resina Spurr de baja viscosidad (Spurr, 1969). Se obtuvieron secciones transversales ultrafinas (aproximadamente 70 nm de grosor) usando una cuchilla de vidrio y utilizando un micrótomos de ultracorte Sorvall MT-2B (Newtown, USA). Las secciones fueron luego colectadas sobre grillas

de cobre y contrastadas mediante la coloración doble con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963) y examinadas a través de un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301 (Eindhoven, Países Bajos) a una aceleración de voltaje de 60 kV.



Resultados

Durante este estudio, se inspeccionaron un total de 197 árboles (AI) y se tomaron muestras de 103 de ellos: 75 con presencia de síntomas (cancros o descortezamiento) (AS) y 28 asintomáticos (AA). Las cuadras muestreadas en este trabajo presentaron entre 4-20 árboles (AI) y entre 2-13 árboles sintomáticos (AS) fueron muestreados por cuadra. Se analizaron un total de 182 muestras de maderas (MM) (provenientes de árboles sintomáticos), resultantes en 1516 fragmentos de MM, y 70 unidades de madera (UM) (provenientes de árboles asintomáticos), resultando en 1643 fragmentos de UM. En la Tabla 9 se resumen los valores correspondientes a los árboles inspeccionados, árboles asintomáticos y sintomáticos, muestras de árboles sintomáticos y unidades de madera de árboles asintomáticos para cada sitio. Tanto los árboles sintomáticos como los asintomáticos presentaron un número similar de especies (1–8 especies por árbol).

1. Muestreos

1.1. Composición de la comunidad de endofitos

A partir de los 1643 fragmentos de árboles asintomáticos se obtuvieron un total de 130 aislamientos. Sesenta y nueve aislamientos se obtuvieron del Sitio A (53%), dos del Sitio B (1,5%), 22 del Sitio C (17%) y 37 del Sitio D (28,5%).

Los aislamientos obtenidos correspondieron a 27 taxones diferentes. En la Tabla 10 se enumeran para cada Sitio las especies aisladas de árboles asintomáticos con su respectiva frecuencia. Las especies *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichosporon sporotrichoides* (un anamorfo de basidiomicete del orden Tremellales) y el género *Trichoderma* correspondieron a la mayoría de los aislamientos obtenidos que, en un 18% del total, se identificaron como *T. sporotrichoides*. *Alternaria alternata* y las especies de *Trichoderma* estuvieron representados por 17 (13% del total) y 12 (11%) aislamientos, respectivamente. Doce aislamientos (aprox. 9%) pertenecieron a *C. cladosporioides*, 11 aislamientos al basidiomicete *Granulobasidium vellereum* (8,5%) y 8 a *Arthrimum phaeospermum* (6%). El resto de las especies representaron cada una menos del 6% del total de aislamientos: 7 aislamientos de *Bipolaris australiensis*, 6 aislamientos del anamorfo de Xylariaceae *Nodulisporium* sp, 5 aislamientos del basidiomicete *Inonotus rickii*, 3 aislamientos de *Curvularia lunata*, *Gliocladium penicillioides*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Pseudoallescheria boydii* y 2 aislamientos de *Aspergillus reptans* y *Epicoccum nigrum*. Del resto de las especies sólo se obtuvo un

aislamiento (Tabla 10; Fig. 9). *Alternaria alternata*, *A. phaeospermum*, *A. reptans*, *B. australiensis*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *T. sporotrichoides* fueron encontrados en más de un sitio de muestreo.

La mayoría de las especies obtenidas pertenecen al Phylum Ascomycota (82%). Los órdenes Pleosporales e Hypocreales presentaron el mayor número de especies (5 cada uno) (Fig. 10). Los ascomicetes sumaron el 68% del total de aislamientos obtenidos, siendo el orden Pleosporales el que presentó el mayor porcentaje de aislamientos (23%). Dentro del Phylum Basidiomycota, los órdenes Tremellales y Agaricales presentaron el mayor número de aislamientos (17% y 10% de los aislamientos totales de endofitos, respectivamente) (Fig. 11).

Las especies frecuentes (con más de un aislamiento), fueron más abundantes (70%) que las especies ocasionales (con sólo un aislamiento).

Sitios	Fragmentos				Aislamientos				
	AI	AS	MM	de MM	de MM	AA	UM	de UM	de de UM
Sitio A	72	30	73	704	117	10	29	696	69
Sitio B	52	15	47	320	34	2	4	96	2
Sitio C	54	30	62	492	82	7	21	504	22
Sitio D	26	0	0	0	0	9	16	347	37
Total	204	75	182	1516	233	28	70	1643	130

Tabla 9: Número de árboles inspeccionados (AI), árboles sintomáticos muestreados (AS), muestras de madera (MM) de árboles sintomáticos, fragmentos obtenidos a partir de MM (fragmentos de MM), aislamientos a partir de MM, árboles asintomáticos (AA), unidades de madera de árboles asintomáticos (UM), fragmentos obtenidos a partir de los UM (fragmentos de UM) y aislamientos a partir de UM.

Especies	Número de aislamientos				
	Sitio A	Sitio B	Sitio C	Sitio D	F
Ascomycota					
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. (ALT)	14	0	1	2	13,08
<i>Arthrinium phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis (PHA)	2	0	6	0	6,15
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. (NIG)	0	0	1	0	0,77
<i>Aspergillus reptans</i> Samson & W. Gams (REP)	1	0	1	0	1,54
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church (UST)	1	0	0	0	0,77
<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama (AUS)	2	0	0	5	5,38
<i>Chaetomium funicola</i> Cooke (FUN)	0	0	1	0	0,77
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze (GLO)	0	0	2	0	1,54
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries (CLA)	12	0	0	0	9,23
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn (LUN)	0	0	0	3	2,31
<i>Epicoccum nigrum</i> Link (EPI)	0	2	0	0	1,54
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (SOL)	0	0	0	1	0,77
<i>Gliocladium penicillioides</i> Corda (PEN)	0	0	0	3	2,31
<i>Nodulisporium</i> (NOD)	6	0	0	0	4,62
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm.) Steyaert (GUE)	3	0	0	0	2,31
<i>Phialemonium curvatum</i> W. Gams & W.B. Cooke (CUR)	0	0	1	0	0,77
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc. (EUP)	0	0	0	1	0,77
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton (ARC)	0	0	0	1	0,77
<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello (BOY)	3	0	0	0	2,31
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb. (STR)	0	0	2	0	1,54
<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst. (ATR)	2	0	0	5	5,38
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (HAR)	4	0	0	1	3,84
Basidiomycota					
<i>Coprinopsis cinerea</i> (Schaeff.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo (CIN)	2	0	0	0	1,54
<i>Granulobasidium vellereum</i> (Ellis & Cragin) Jülich (VEL)	11	0	0	0	8,46
<i>Inonotus rickii</i> (Pat.) D.A. Reid (INO)	5	0	0	0	3,84
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (Burds.) (CHR)	0	0	1	0	0,77
<i>Trichosporon sporotrichoides</i> (Oorschot) Oorschot & de Hoog (SPO)	1	0	6	15	16,92
Número total de aislamientos	69	2	22	37	

Tabla 10: Listado de especies fúngicas, número de aislamientos en cada Sitio de muestreo y frecuencia relativa (*F*) de las mismas en madera de plátanos asintomáticos de 4 sitios de muestreos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Entre paréntesis se muestran las abreviaturas de las especies fúngicas.

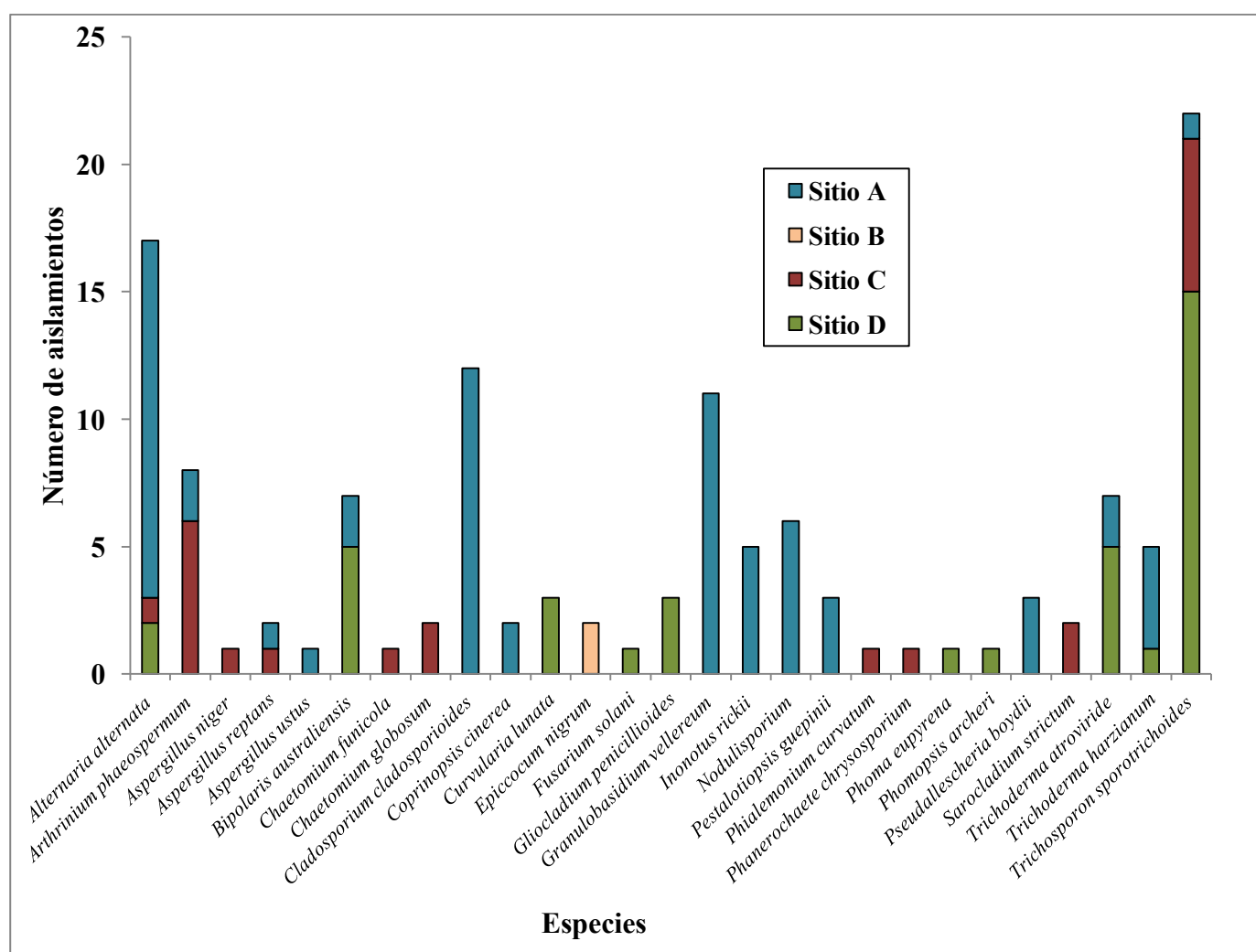


Figura 9: Número de endofitos fúngicos aislados de plátanos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina, en los 4 sitios de muestreo.

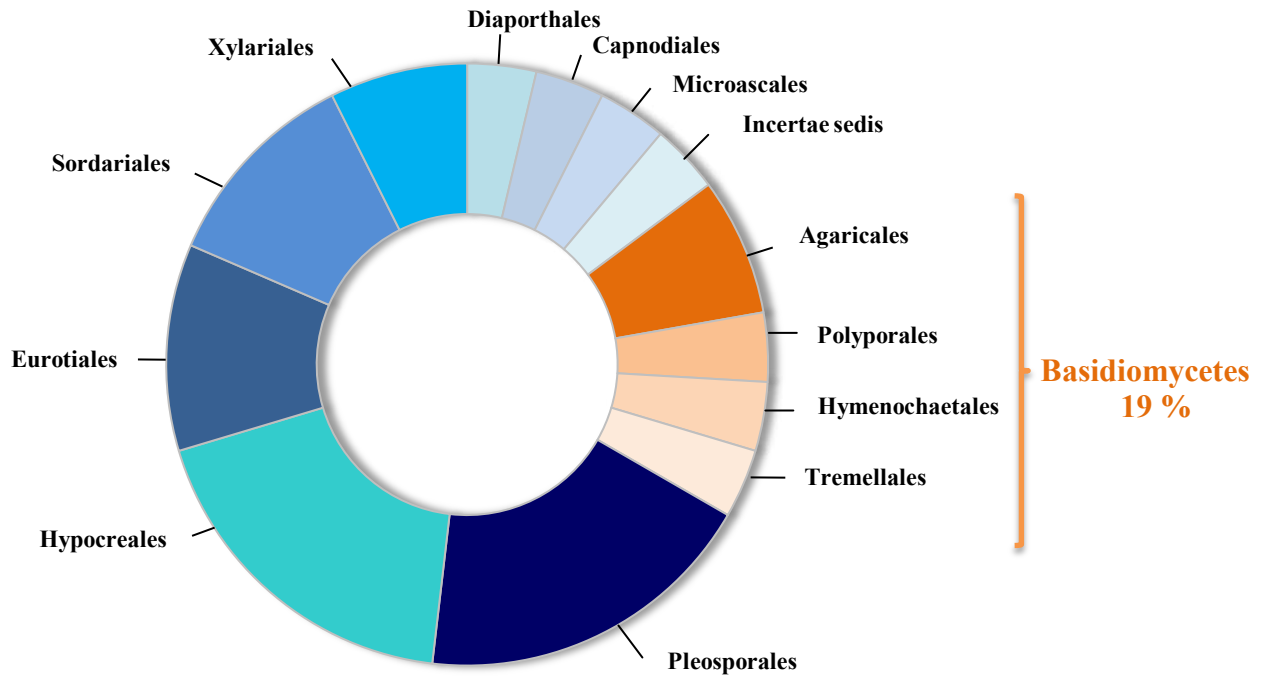


Figura 10: Distribución de las especies de endofitos (N=27) en sus correspondientes órdenes de ascomicetes y basidiomicetes.

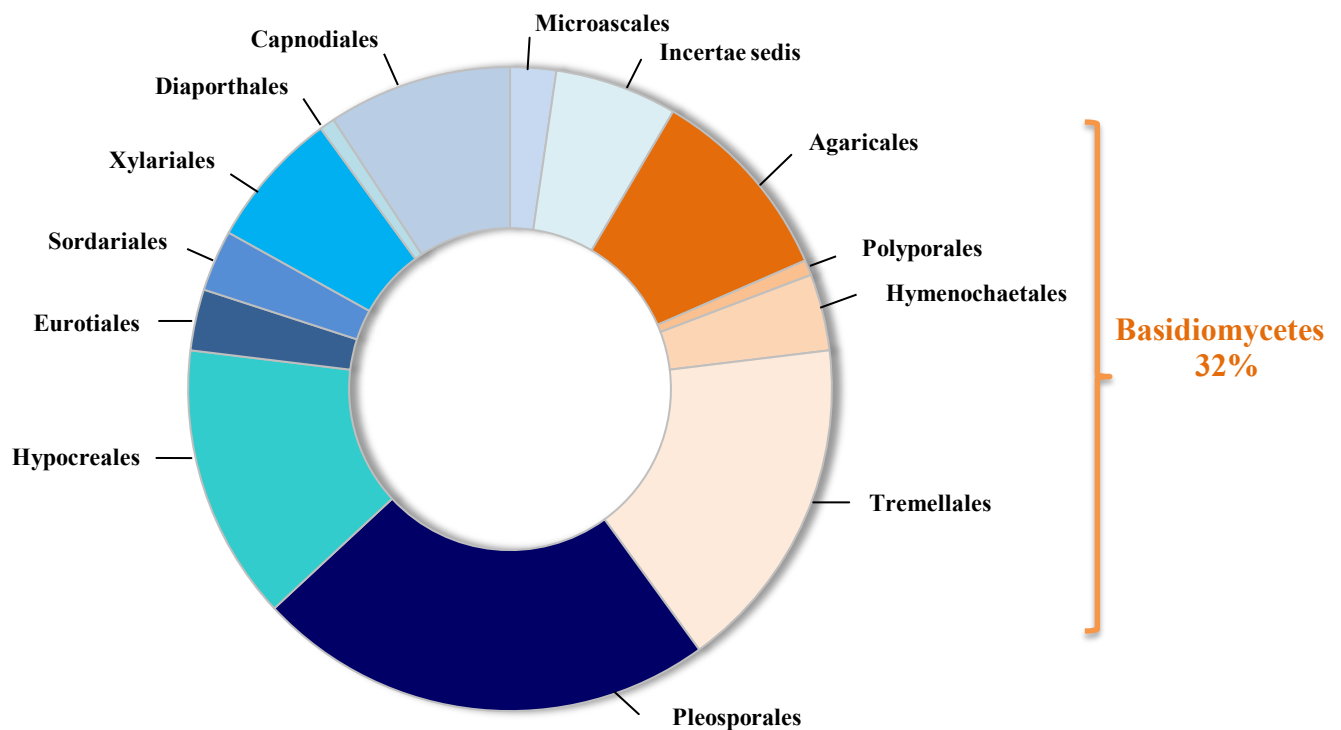


Figura 11: Distribución de los aislamientos de endofitos (N=130) en sus correspondientes órdenes de ascomicetes y basidiomicetes.

1.1.1. Diversidad alfa y beta de endofitos

El Sitio A fue el que mostró la mayor cantidad de especies, con 15 especies, seguido por los Sitios C (10 especies) y D (10 especies). En el Sitio B se registró solamente una especie (Tabla 10) y debido a esta baja cantidad de especies, este sitio fue excluido de los posteriores análisis de diversidad.

A partir del programa EstimateS se analizó el comportamiento de diferentes estimadores de riqueza con el fin de seleccionar aquel que resultara menos sensible al tamaño de muestra (aislamientos totales) en todos los sitios, eligiéndose al estimador MM-Means (Fig. 12-14). El Sitio C mostró el mayor valor, seguido del Sitio A y del Sitio D (Tabla 11).

De igual manera se analizó el comportamiento de diferentes índices de diversidad con el fin de seleccionar aquel menos sensible al tamaño de muestra en todos los sitios, escogiéndose al índice de diversidad de Shannon-Weiner (Fig. 15-17). La mayor diversidad se encontró en el Sitio A, seguido por el Sitio C y el Sitio D (Tabla 11). El índice de diversidad (H) al considerar todas las especies fue 2,84.

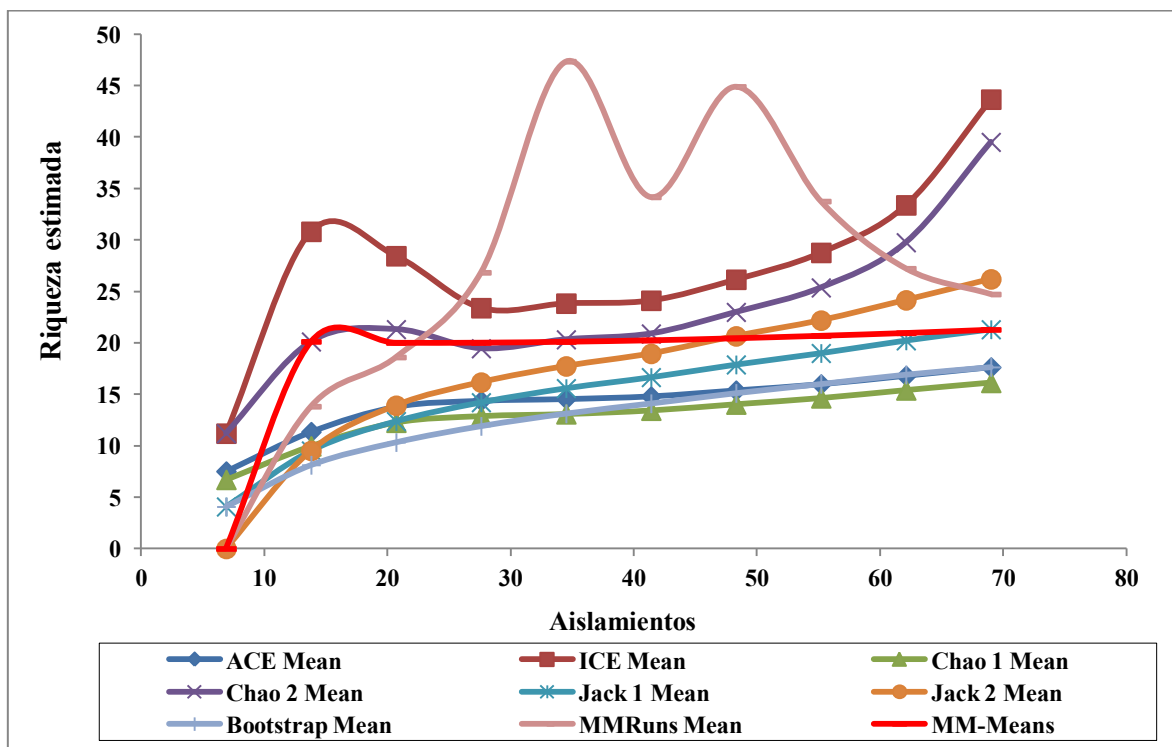


Figura 12: Comportamiento de diferentes estimadores de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio A.

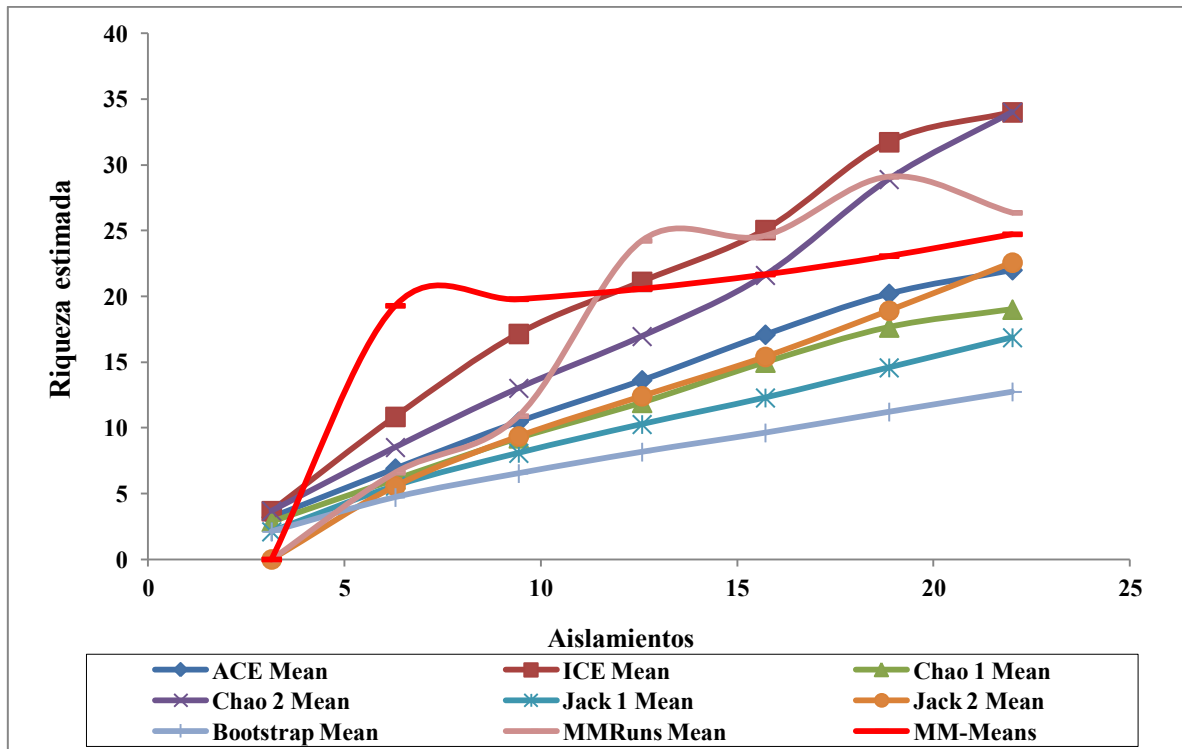


Figura 13: Comportamiento de diferentes estimadores de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio C.

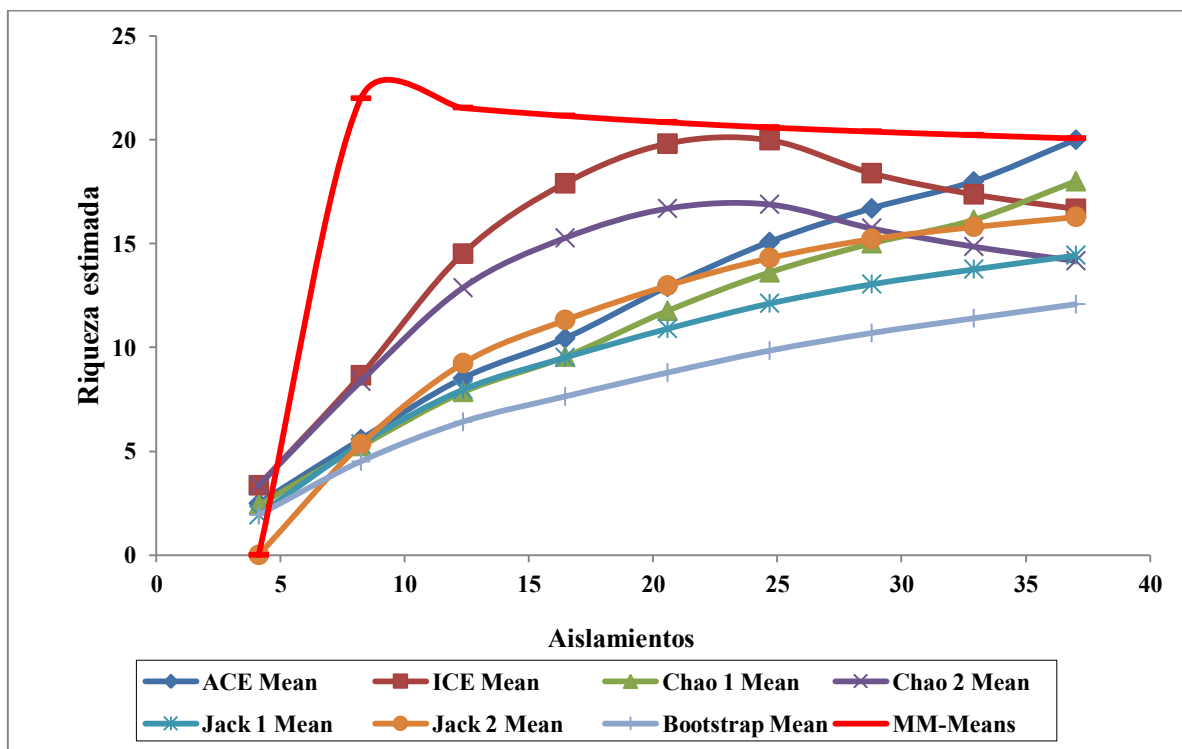


Figura 14: Comportamiento de diferentes estimadores de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio D. Se excluyó del gráfico al estimador MMRuns Mean debido a que presentaba valores mucho más elevados que el resto de los estimadores.

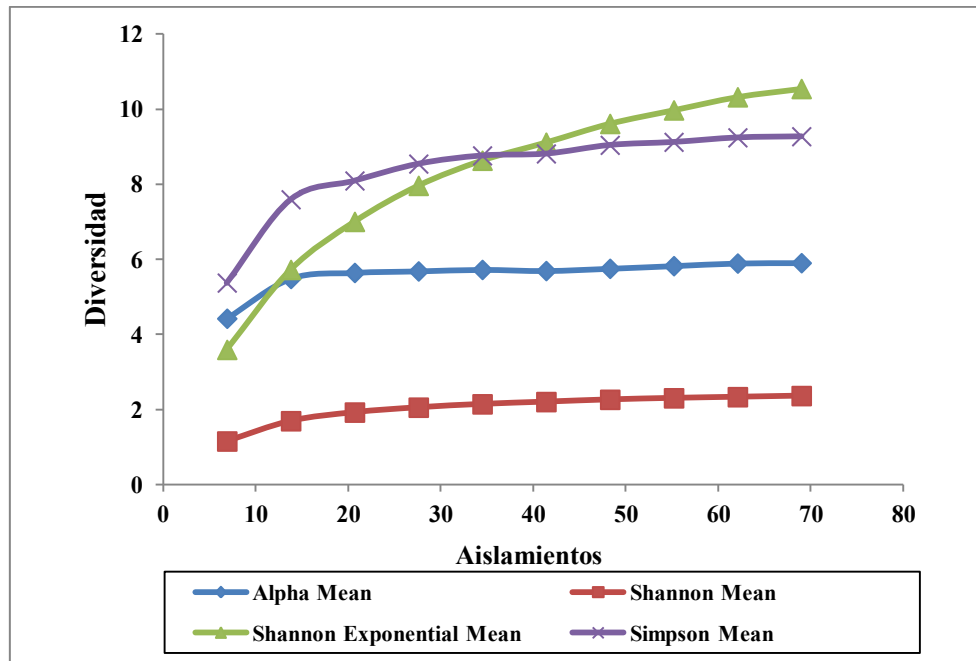


Figura 15: Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio A.

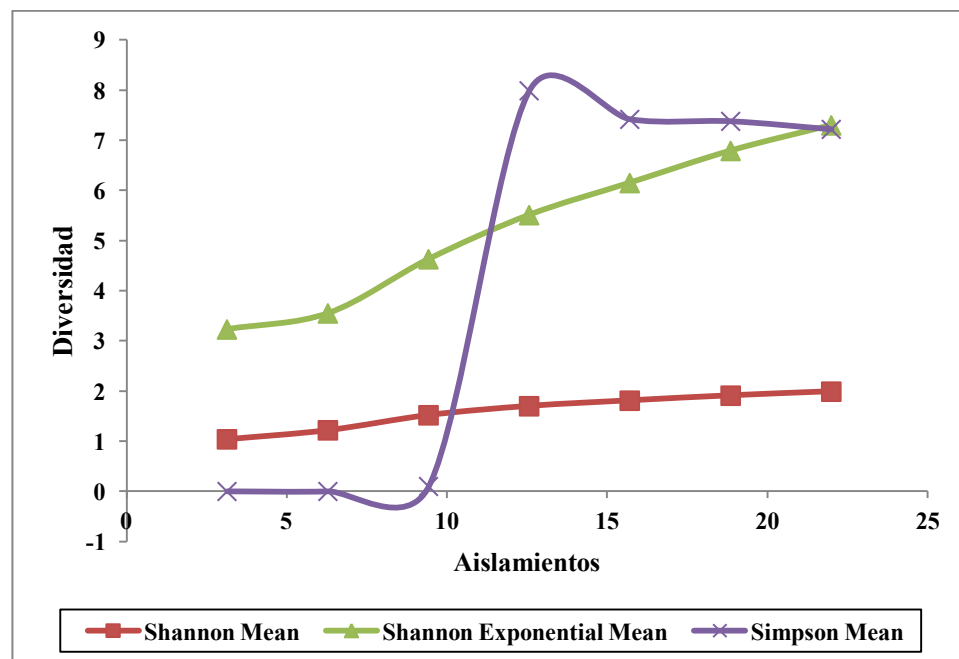


Figura 16: Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio C. Se excluyó del gráfico al índice Alpha Mean debido a que presentaba valores mucho más elevados que el resto de los estimadores.

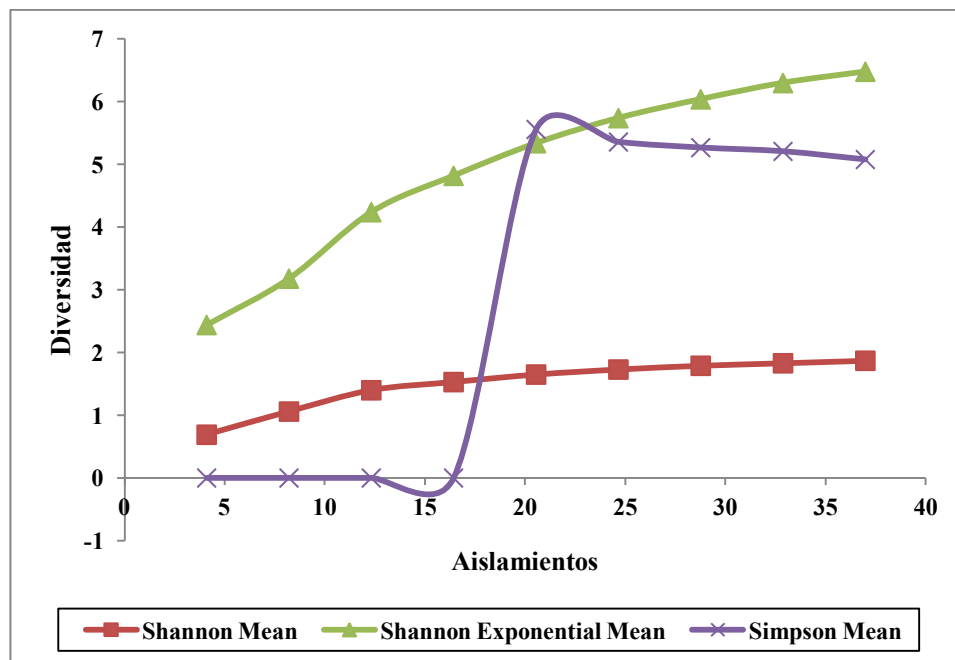


Figura 17: Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio D. Se excluyó del gráfico al índice Alpha Mean debido a que presentaba valores mucho más elevados que el resto de los estimadores.

	Sitio A	Sitio C	Sitio D
Riqueza (S)	15	10	10
Riqueza estimada por estimador Raaijmakers (MM-Means)	21,28	24,73	20,08
Índice de Shannon-Weiner (H)	2,36	1,97	1,87

Tabla 11: Riqueza, riqueza estimada e índice de diversidad de endofitos para los Sitios A, C y D.

En la Figura 18 se muestran las curvas de acumulación de especies esperadas para los Sitios A, B y C. En las Figuras 19-21 se muestran la curva de acumulación para cada sitio junto con sus intervalos de confianza.

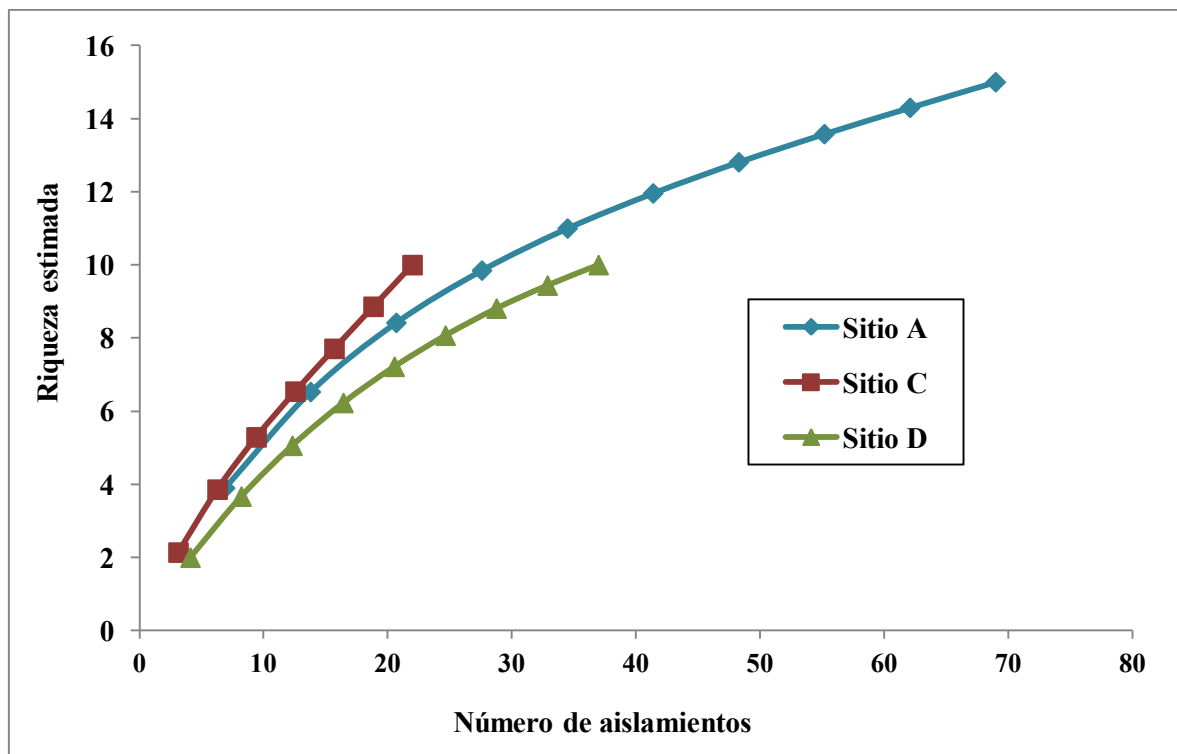


Figura 18: Curvas de acumulación de especies esperadas de endofitos fúngicos para diferentes sitios de muestreo.

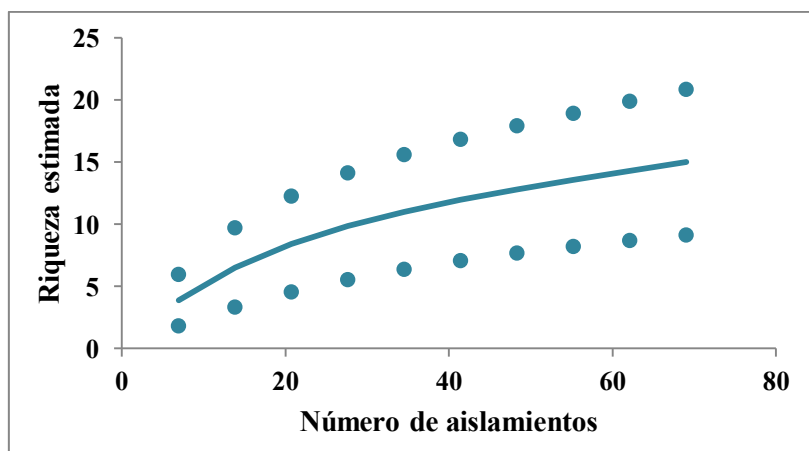


Figura 19: Curva de acumulación de especies para el sitio A. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza (95 %).

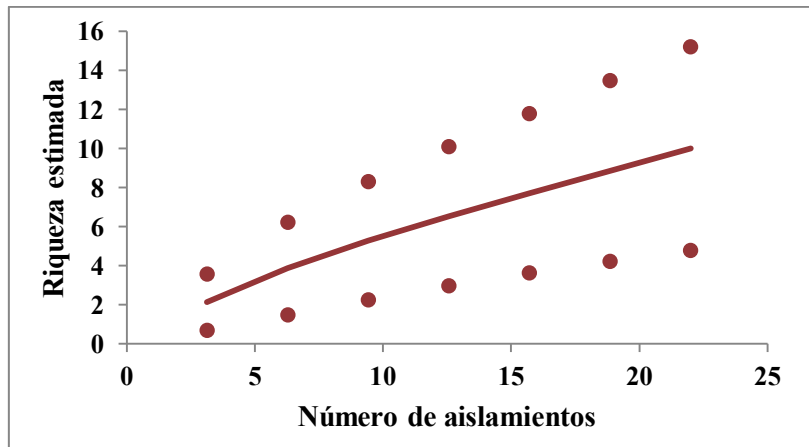


Figura 20: Curva de acumulación de especies para el sitio C. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza (95 %).

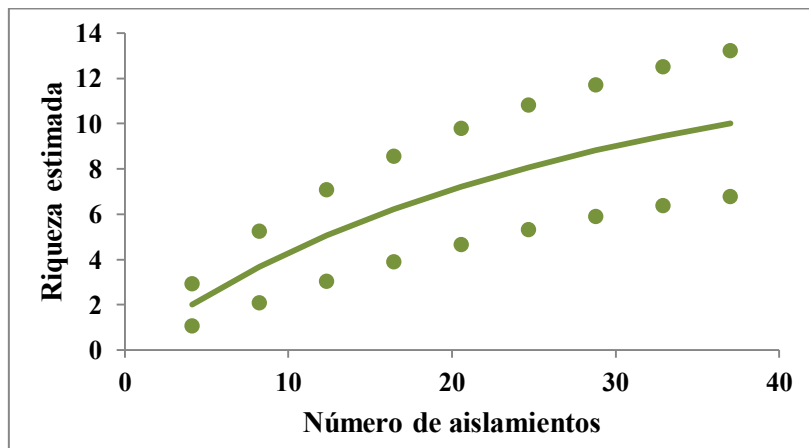


Figura 21: Curva de acumulación de especies para el sitio D. Las líneas de puntos indican los intervalos de confianza (95 %).

El índice de similitud de Sørensen fue mayor entre los Sitios A y D y menor entre los Sitios C y D (Tabla 12).

Sitios	Índice de Sørensen	
	Sitio C	Sitio D
Sitio A	0,32	0,40
Sitio C	-	0,20

Tabla 12: Índice de similitud de especies de endofitos entre los Sitios A, C y D.

1.2. Análisis de los basidiomicetes totales de árboles sintomáticos y asintomáticos

Al considerar en el análisis el total de aislamientos de basidiomicetes, tanto de árboles sintomáticos como de árboles asintomáticos:

- Se obtuvieron un total de 50 aislamientos de basidiomicetes, pertenecientes a 7 especies. Nueve aislamientos fueron obtenidos de muestras de madera de árboles sintomáticos y los 41 restantes de unidades de árboles asintomáticos.
- Veintiséis aislamientos fueron obtenidos del Sitio A (52%), uno en el Sitio B (2%), ocho en el Sitio C (16%) y quince en el Sitio D (30%).
- De los 26 aislamientos del Sitio A, 11 correspondieron a la especie *Granulobasidium vellereum* y todos fueron obtenidos a partir de árboles asintomáticos. Cinco aislamientos fueron identificados como pertenecientes a *Inonotus rickii*. Uno de ellos se obtuvo de un árbol sintomático y los cuatro restantes a partir de árboles asintomáticos. Cinco aislamientos, todos ellos a partir de árboles sintomáticos, correspondieron a la especie *Coprinellus micaceus*. Se obtuvieron dos aislamientos de *Coprinopsis cinerea* a partir de un árbol asintomático. *Hymenochaete* sp. fue aislado una vez a partir de un árbol sintomático y *Trichosporon sporotrichoides* fue registrado una vez, en un árbol asintomático.
- En el Sitio B, se obtuvo un aislamiento de *Inonotus rickii* a partir de un árbol sintomático.
- En el Sitio C, se obtuvieron 8 aislamientos de basidiomicetes, 6 correspondientes a *Trichosporon sporotrichoides*, todos de árboles asintomáticos; uno perteneciente a *Coprinellus micaceus*, a partir de un árbol sintomático, y el restante perteneciente a *Phanerochaete chrysosporium*, a partir de un árbol asintomático.
- En el Sitio D, los 15 aislamientos obtenidos pertenecieron a *Trichosporon sporotrichoides*, a partir de árboles asintomáticos.

Trichosporon sporotrichoides fue el basidiomicete más frecuente, con un total de 22 aislamientos, *Granulobasidium vellereum* e *Inonotus rickii* fueron las siguientes especies de basidiomicetes más frecuentemente aisladas, con 11 y 6 aislamientos respectivamente. *Trichosporon sporotrichoides* fue registrado en 3 sitios diferentes de muestreo (A, C y D). *Inonotus rickii*, por su parte, fue aislado en dos sitios (A y B) y fue el único basidiomicete detectado tanto en árboles sintomáticos como en árboles asintomáticos (Fig. 22).

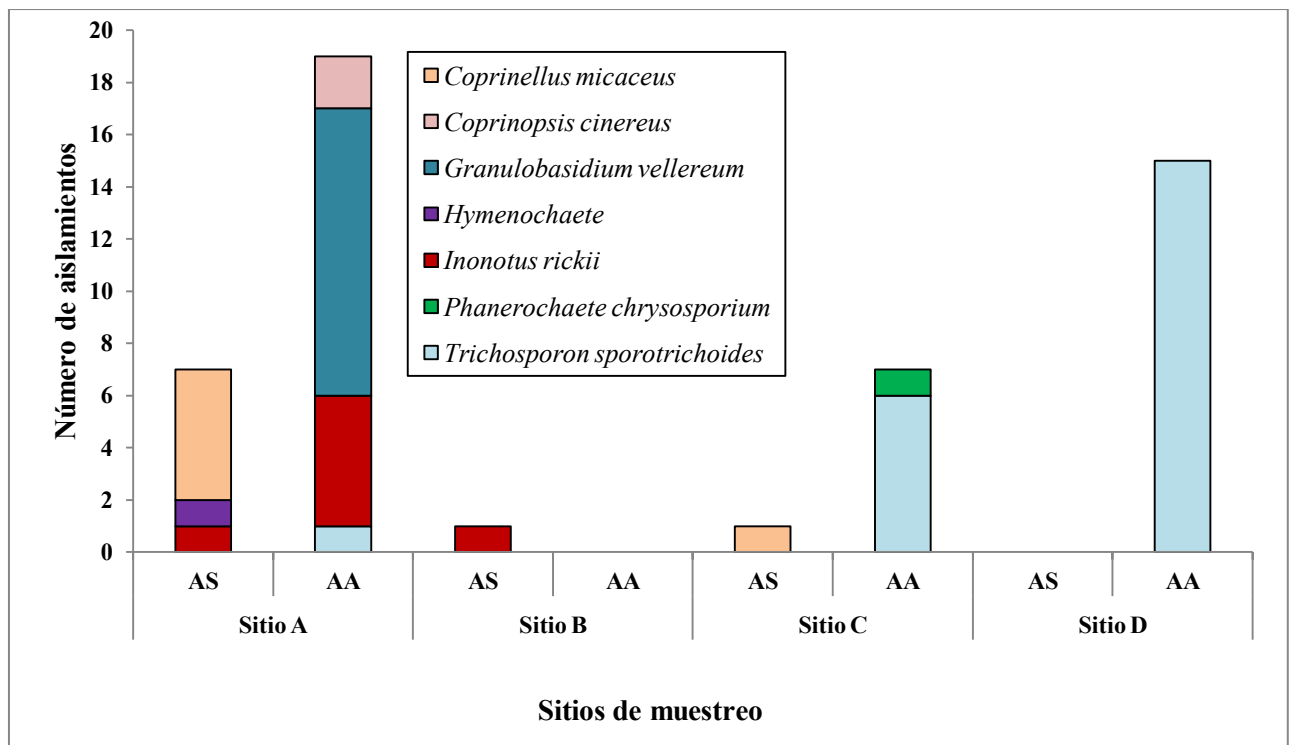


Figura 22: Identidad, número de aislamientos y fuente de aislamiento (AS o AA) en cada sitio de muestreo de basidiomicetes obtenidos de madera de *P. acerifolia* en Ciudad de Buenos Aires.

La mayoría de los árboles inspeccionados en los Sitios A y C, mostraron valores de DAP de entre 56-65 cm, lo que sugiere edades estimadas de entre 70-80 años, de acuerdo a Linsen *et al.* (2005). En los Sitios B y D, por el otro lado, se observó una variación en los valores de DAP de los árboles inspeccionados (AI), la mayoría con valores de entre 36 a 65 cm, lo que correspondería a edades estimadas de entre 20 a 80 años (Linsen *et al.*, 2005) (Fig. 23). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en un estudio previo (Robles *et al.*, 2011). Una distribución similar de valores de DAP se observó también al comparar los árboles sintomáticos muestreados (AE) (Fig. 24).

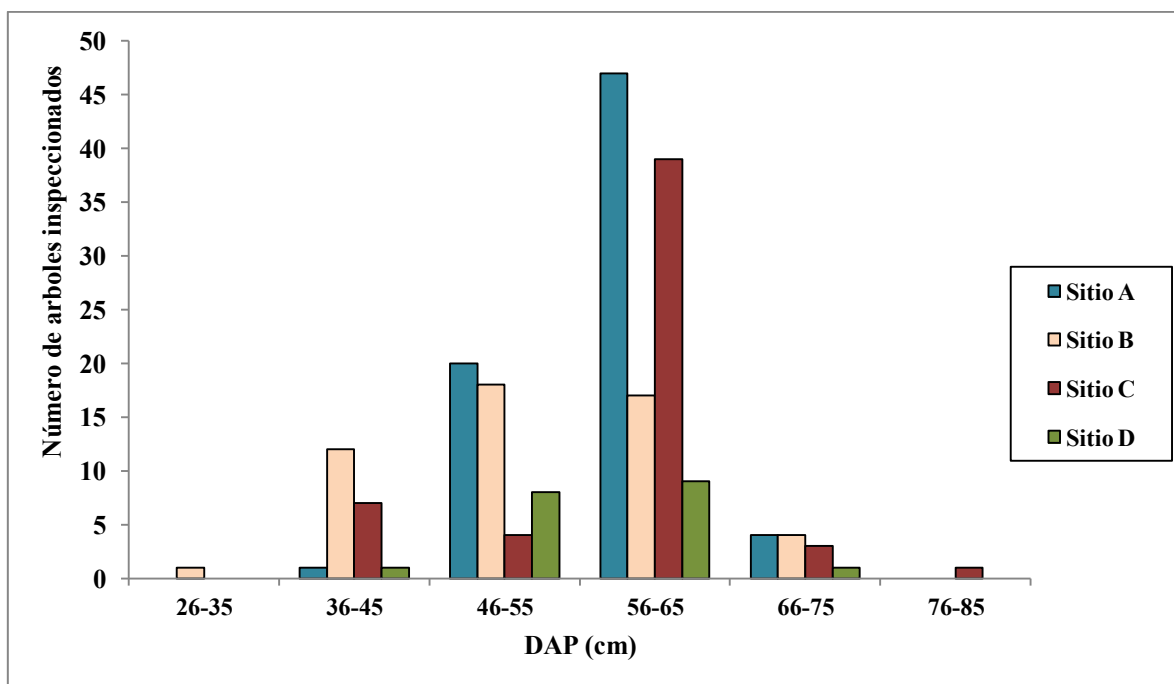


Figura 23: Número de árboles inspeccionados (AI) según sus valores de DAP (diámetro a la altura del pecho).

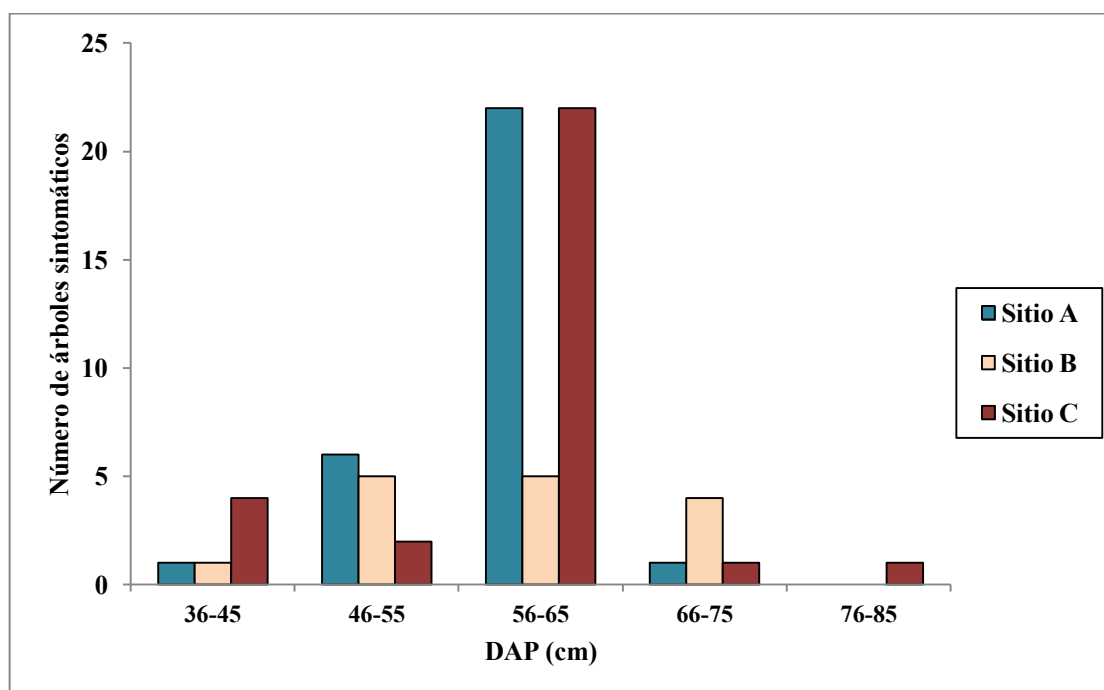


Figura 24: Número de árboles sintomáticos muestreados (AS) según sus valores DAP (diámetro a la altura del pecho).

La mayoría de los árboles sintomáticos colonizados por basidiomicetes presentaron un gran tamaño (valores DAP 56-65 cm). La frecuencia de los rangos de los valores DAP presentaron diferencias significativas entre sí al ser analizados con un test chi-cuadrado con corrección de Yates ($\chi^2 = 10.72$, $p < 0.05$, grados de libertad=3) (Fig. 25).

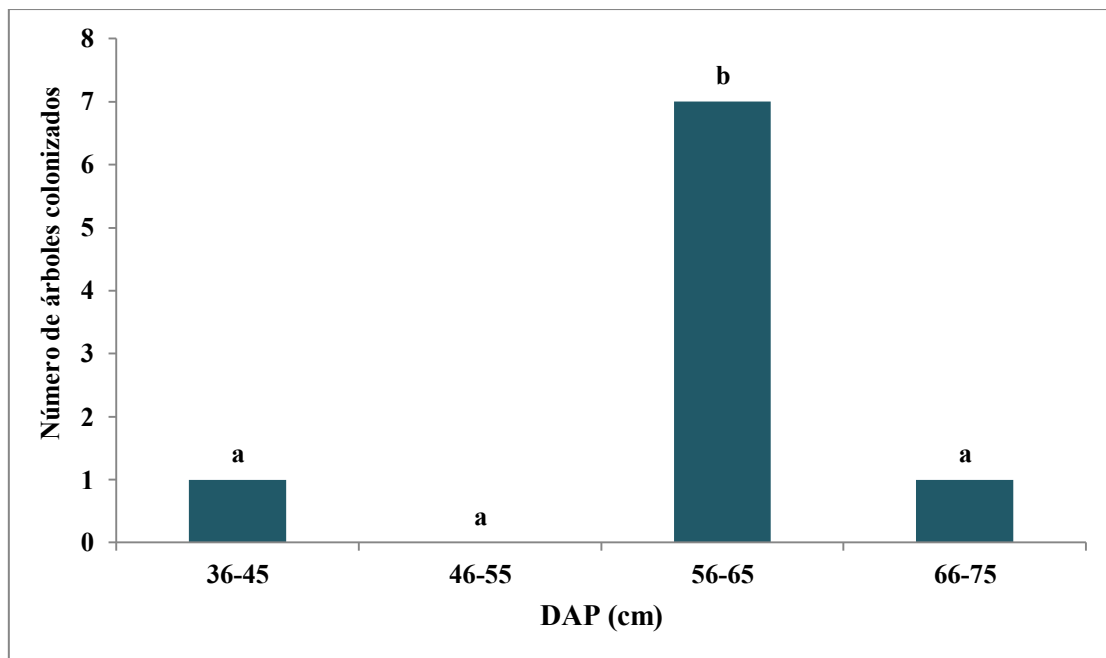


Figura 25: Número de árboles colonizados (AC) según sus valores DAP (diámetro a la altura del pecho). Las letras diferentes representan diferencias significativas en las frecuencias de árboles colonizados en relación a sus valores DAP.

1.3. Resultados de Análisis Canónico de Correspondencias

Los resultados del análisis de CCA muestran la distribución de los 28 árboles asintomáticos muestreados y las 27 especies de endofitos obtenidas en relación con las 3 variables seleccionadas. El primer y segundo eje (*eigenvalues* 0,74 y 0,69, respectivamente) explicaron el 14,6 % de la varianza acumulada de las especies y el 74,5 % de la varianza acumulada de las relaciones entre especies-ambiente. La suma de todos los *eigenvalues* canónicos fue de 1,92 (20% de la inercia o dispersión total). Las 3 variables ambientales se correlacionaron negativamente con el eje 1 y mostraron los siguientes valores de *Inter-set Correlation* (ISC): $ISC_{DAP} = -0,52$; $ISC_{\%Bas} = -0,91$; $ISC_{ND} = -0,20$. Al mismo tiempo, las 3 variables ambientales se correlacionaron positivamente con el eje 2 ($ISC_{DAP} = 0,22$; $ISC_{\%Bas} = 0,21$; $ISC_{ND} = 0,89$). Tanto el eje 1 como el conjunto de todos los ejes canónicos fueron significativos (Test de permutación de Monte-Carlo: $F\text{-ratio} = 1,71$; $p = 0,03$ para el eje 1 y $F\text{-ratio} = 1,70$; $p = 0,001$ para todos los ejes).

La distribución de las especies endofíticas (Fig. 26) permitió distinguir 3 grupos en el gráfico en base a las variables consideradas: el grupo I incluyó a las especies

Bipolaris australiensis, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani*, *Gliocladium penicillioides*, *Phoma eupyrena*, *Phomopsis archeri*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Trichosporon sporotrichoides*, las cuales se observaron asociadas a un bajo nivel de disturbio antrópico, bajos valores DAP del hospedante y ausencia de basidiomicetes en árboles sintomáticos cercanos (debido a la ausencia de fragmentos de MM colonizados por basidiomicetes). El grupo II comprendió a las especies *Arthrimum phaeospermum*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium funicola*, *Epiccocum nigrum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phialemonium curvatum* y *Sarocladium strictum*, asociadas a altos valores de disturbio antrópico y el grupo III incluyó a las especies *Alternaria alternata*, *Aspergillus reptans*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coprinopsis cinerea*, *Granulobasidium vellereum*, *Inonotus rickii*, *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis guepinii* y *Pseudallescheria boydii*, asociadas a altos valores DAP del hospedante y presencia de basidiomicetes en árboles sintomáticos cercanos (mayor número de fragmentos de MM colonizados por basidiomicetes). El grupo III asimismo presentó la mayor cantidad de especies de basidiomicetes (*Coprinopsis cinerea*, *Granulobasidium vellereum* e *Inonotus rickii*). El grupo I comprendió al basidiomicete *Trichosporon sporotrichoides* y el grupo II a *Phanerochaete chrysosporium*.

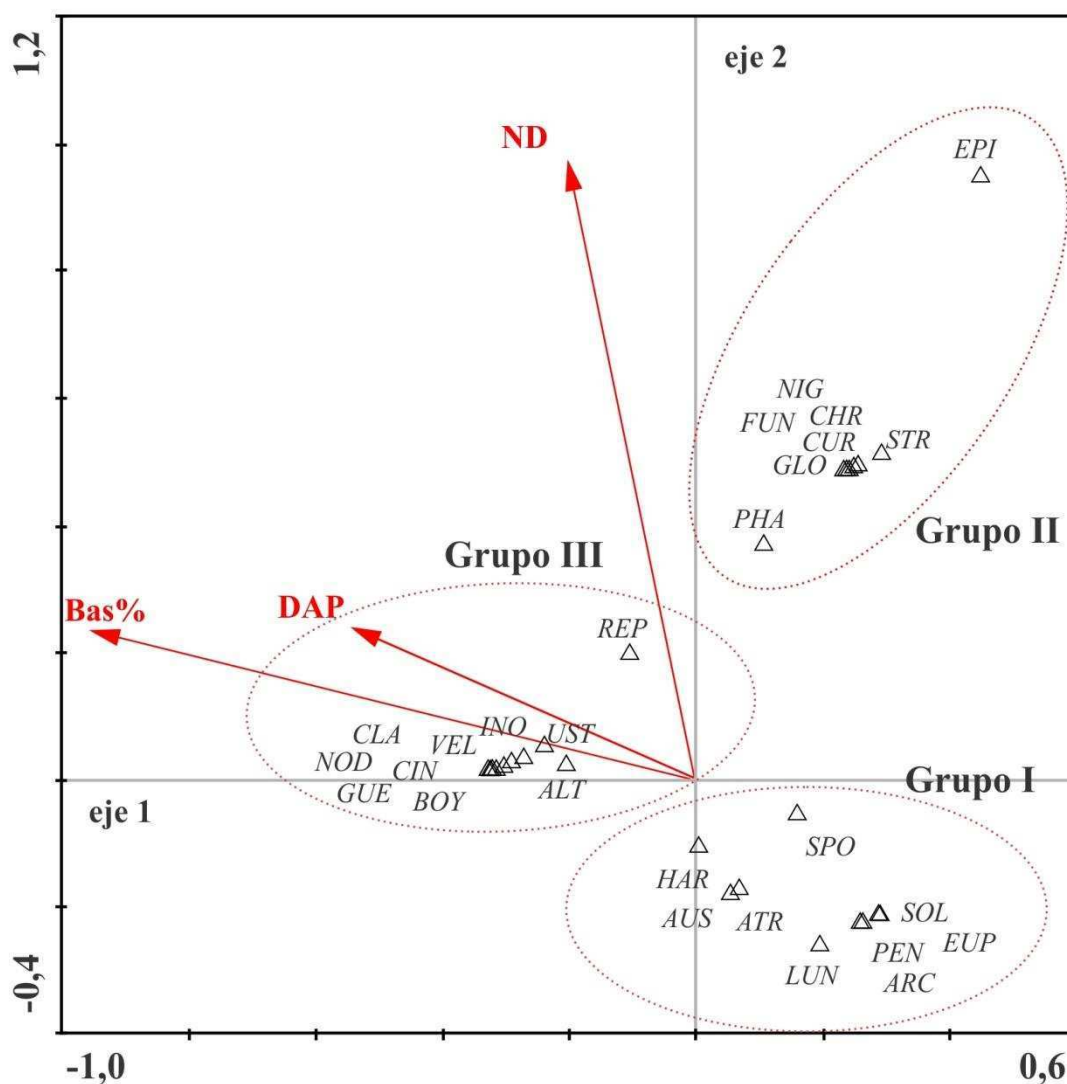


Figura 26: Ordenamiento a partir del Análisis Canónico de Correspondencias (ejes 1 y 2) de las especies endofíticas (n=27). En la Tabla 9 se encuentran la abreviatura de cada especie. DAP: diámetro a la altura del pecho (cm); ND: nivel de disturbio; Bas%: porcentaje de fragmentos de MM colonizados por basidiomicetes.

1.4. Análisis espacial de la diversidad registrada

Se obtuvieron cantidades similares de aislamientos de endofitos en los diferentes segmentos de las unidades de madera (D1, D2 y D3) (Fig. 27).

Al comparar la cantidad de aislamientos de endofitos totales obtenidos a partir de las unidades de madera ubicadas en la base del tronco y aquellas unidades tomadas en el tronco a la altura del pecho (siempre considerando solamente aquellos árboles de los cuales se tomaron muestras de unidades a ambas alturas, y sin considerar los

aislamientos obtenidos de unidades luego de 3 meses de incubación), se observó que se registró un número similar de aislamientos para ambas alturas del árbol: 41 aislamientos se obtuvieron de unidades tomadas de la base del árbol (46%) y 47 a partir de unidades a la altura del pecho (54%).

Finalmente un 23% de los aislamientos totales de endofitos (30) fueron registrados a partir de unidades de madera (sacadas a la altura del pecho) luego de 3 meses de incubación.

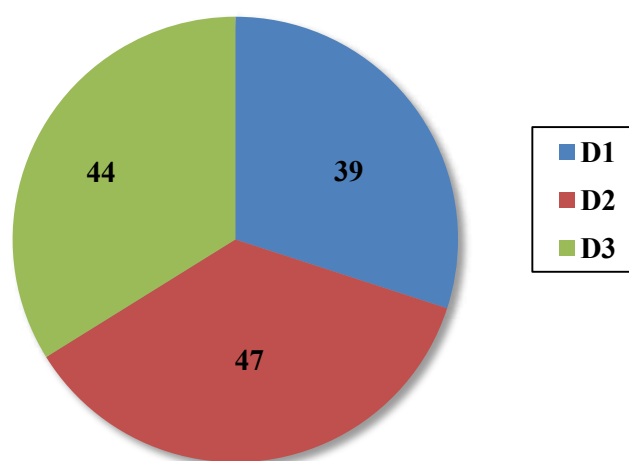


Figura 27: Aislamientos de endofitos obtenidos en los diferentes segmentos en que fueron divididas las unidades de madera. N total = 130. Los números indican la cantidad de aislamientos para cada segmento.

1.5. Recuperación de aislamientos en diferentes medios de cultivo

La mayoría de los aislamientos de endofitos (58%) se obtuvieron en extracto de malta 1,25% con cloranfenicol (MeClo) (Fig. 28). Los basidiomicetes totales (patógenos y endofíticos) fueron aislados en similar número en los medios MeClo y BDS (Fig. 29). Ninguna especie de basidiomicete mostró una tendencia a crecer en un medio particular (números absolutos no mostrados). Sin embargo, los basidiomicetes patógenos fueron aislados mayoritariamente en medio MeClo (Fig. 30), mientras que los basidiomicetes endofíticos fueron aislados principalmente a partir de medio BDS (N=22, 54% del total de aislamientos de basidiomicetes endofíticos) (Fig. 31).

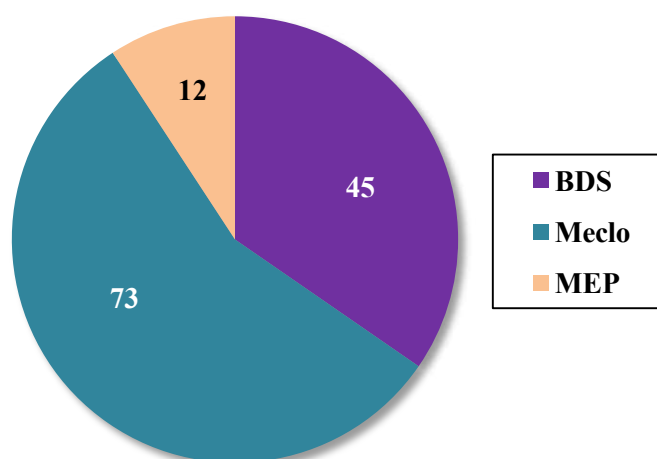


Figura 28: Aislamientos de endofitos obtenidos en los diferentes medios de cultivo. N total = 130. Los números indican la cantidad de aislamientos para cada medio. BDS = medio selectivo para basidiomicetes; Meclo= extracto de malta 1,25% con antibiótico cloranfenicol; MEP= extracto de malta-peptona-glucosa.

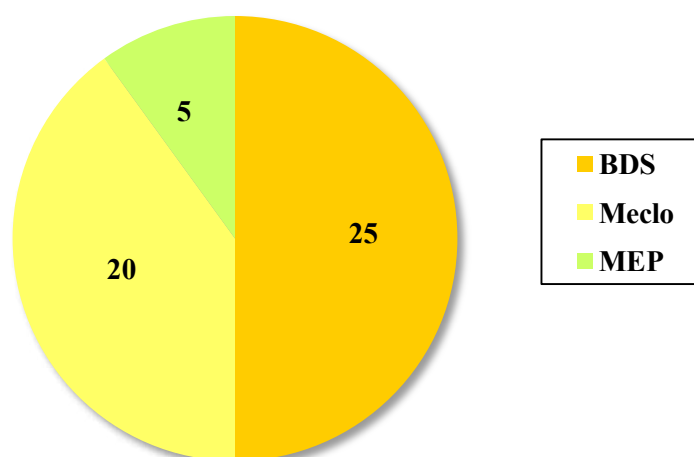


Figura 29: Aislamientos de basidiomicetes totales obtenidos en los diferentes medios de cultivos. N total = 50. Los números indican la cantidad de aislamientos para cada medio. BDS = medio selectivo para basidiomicetes; Meclo= extracto de malta 1,25 % con antibiótico cloranfenicol; MEP= extracto de malta-peptona-glucosa.

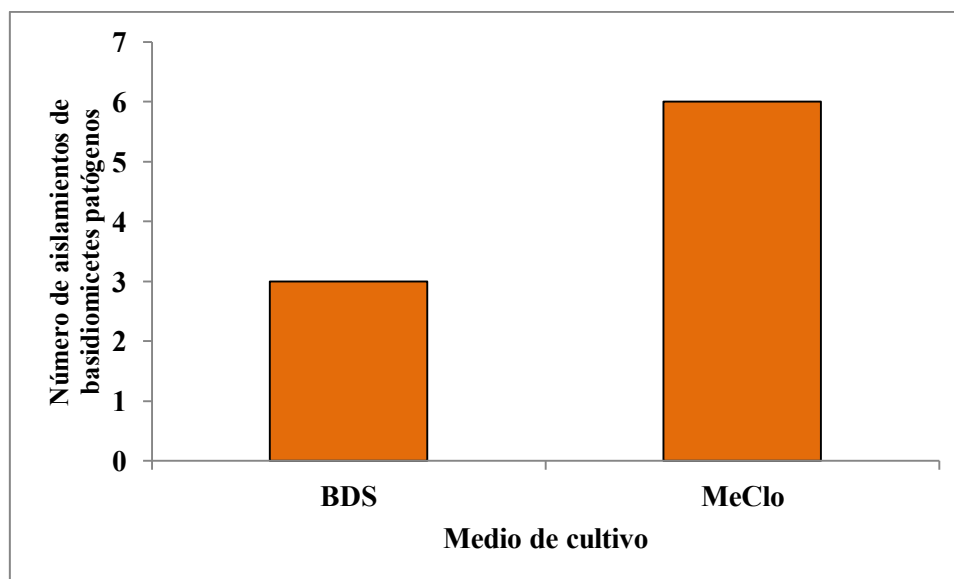


Figura 30: Número de aislamientos de basidiomicetes patógenos obtenidos en diferentes medios de cultivo. N total = 9. Los números indican la cantidad de aislamientos para cada medio. BDS = medio selectivo para basidiomicetes; MeClo= extracto de malta 1,25% con antibiótico cloranfenicol; MEP= extracto de malta-peptona-glucosa.

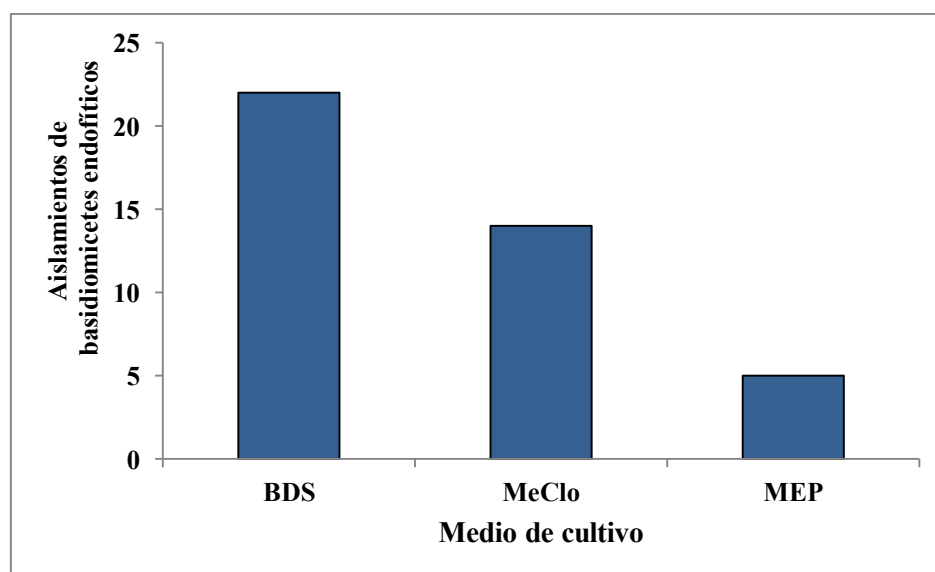


Figura 31: Aislamientos de basidiomicetes endofíticos obtenidos en diferentes medios de cultivo. N total = 41. Los números indican la cantidad de aislamientos para cada medio. BDS = medio selectivo para basidiomicetes; MeClo= extracto de malta 1,25% con antibiótico cloranfenicol; MEP= extracto de malta-peptona-glucosa.

2. Descripciones y consideraciones sobre las especies encontradas

2.1. Ascomicetes endofíticos

Alternaria alternata (Fr.) Keissl., *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt* 29: 433 (1912) (Fig. 32A, B)

Clase Pleosporomycetidae

Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

Descripción: ver Domsch *et al.* (2007) y Ellis (1971).

Colonias grisáceas oscuras. Conidióforos emergiendo solitarios o en pequeños grupos, simples o ramificados, castaño dorado oscuros, lisos, 3-5 μm de ancho, con 1 o varias cicatrices por formación de conidios. Conidios de color pálido a castaño dorado, formados en cadena, ovoides o elipsoidales, generalmente con un pico corto cilíndrico o cónico en uno de sus extremos, lisos o verrugosos, con numerosos septos transversales y longitudinalmente, hasta oblicuos, (11) 18-50 (60) x 8-18 μm , extremo de color más claro que el resto del conidio, 2-5 μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 25-VIII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4325); ídem, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 18-IV-2011 (BAFCcult 4339).

Notas: Este género es cosmopolita, apareciendo en muchos tipos de plantas y restos de ellas (Seifert *et al.*, 2011). *Alternaria alternata* ha sido citada en numerosas oportunidades como endofito de hoja y pecíolo (Novas & Carmarán, 2008; Fisher *et al.*, 1994). Sin embargo, en los últimos tiempos se lo ha encontrado colonizando madera como endofito (Bettucci *et al.*, 1999; Gazis & Chaverri, 2010; Sun *et al.*, 2011; entre otros). En Argentina se lo ha citado como endofito de 5 cultivares de trigo (Larran *et al.*, 2007), y endofito de *Broussonetia papyrifera* y *Ligustrum lucidum* (Novas & Carmarán, 2008).

Arthrinium phaeospermum (Corda) M.B. Ellis, *Mycological Papers* 103: 8 (1965) (Fig. 32C-E)

Clase Sordariomycetidae

Orden Incertae sedis

Familia Apiosporaceae

Descripción: ver Domsch *et al.* (2007) y Ellis (1971).

Colonias inicialmente blancas, adoptando con el tiempo una coloración más oscura en ciertos sectores por la acumulación de masas de conidios. Conidióforos 1-2,5 µm de ancho, erectos, simples, cilíndricos, hialinos, lisos. Conidios lenticulares, castaño dorado oscuro con falta de coloración en la zona central del conidio, 7-11 µm largo en vista ecuatorial, 5-8 µm diámetro en vista polar.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,85"S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 29-VII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4312); ídem, 34° 39' 27,30" S 58° 29' 14,03" O (**Sitio C-C4**), 21-XI-2011 (BAFCcult 4379); ídem, 34° 39' 28,33" S 58° 29' 27,65" O (**Sitio C-C3**), 21-XI-2011 (BAFCcult 4406).

Notas: El género *Arthrinium* es cosmopolita y se encuentra muy asociado a plantas, especialmente pastos (Poaceae) (Seifert *et al.*, 2011). El género fue previamente encontrado colonizando tejido xilemático sano de *Eucaliptus globulus* (Bettucci *et al.*, 1999) y como endofito de hoja del llamado árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*) (Gazis & Chaverri, 2010). *Arthrinium phaeospermum* ha sido reportado como endofito de madera en *Vitis vinífera* en baja frecuencia (González & Tello, 2010). En Argentina se ha citado a *Arthrinium* sp. como endofito de trigo (Larran *et al.*, 2007) y *A. phaeospermum* ha sido citado en numerosas ocasiones colonizando gramíneas, como en el caso del trabajo de González *et al.* (2008).

Aspergillus niger Tiegh., *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 8: 240 (1867) (Fig. 32F, G)

Clase Eurotiomycetidae

Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Descripción: ver Klich (2002).

Colonias negras o muy oscuras. Vesículas biseriadas, casi esféricas 32-58 μm diámetro; pie muy largo, con paredes gruesas, 9-23 μm ancho; fiálides 6-10 x 3-5 μm ., métulas 18-58 x 8 (12) μm , a veces con 1-2 septos. Conidios globosos, con finas rugosidades, (3) 4 (5) μm diámetro.

De acuerdo al protocolo de Klich (2002): colonias luego de 7 días de incubación, en mm: CYA 25°C: 36-50 (colonias muy dispersas); MEA: 32-47; CYA 37°C colonias muy dispersas; CZ: 43.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 27,30" S 58° 29' 14,03" O (**Sitio C-C4**), 21-XI-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4448).

Notas: El género *Aspergillus* es cosmopolita, más diverso en los trópicos y subtrópicos; apareciendo en suelos, plantas, estiércol, entre otros sustratos (Seifert *et al.*, 2011). *Aspergillus niger* es una de las especies más fácilmente reconocibles de este género y se ha encontrado colonizando una amplia gama de sustratos además de considerarse como un invasor del suelo más que como un habitante del mismo (Domsch *et al.*, 2007). Se lo ha encontrado además en rizosferas de plantas, en semillas, nueces y frutas secas (Klich, 2002). Citado previamente para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009). *Aspergillus niger* ha sido previamente registrado como endofito de madera en *Vitis vinífera* (González & Tello, 2010) y *Pinus sylvestris* (Giordano *et al.*, 2009).

Aspergillus reptans Samson & W. Gams, *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (New York) 48 (1985) (Fig. 32H-K)

Clase Eurotiomycetidae

Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Descripción: ver Pitt & Hocking (1997).

Colonias de color amarillento-verdoso en MEA y verdoso en CYA y CZ. Reverso pálido, amarillo apagado. Vesículas uniseriadas, 15-30 μm diámetro, fértiles en toda su superficie; pie (6) 8-12 μm ancho; fálides ampuliformes, 6-10 (13) x 3-5 (6,5) μm . Conidios subglobosos a elipsoidales, con rugosidades, 6-12 (14) x (3) 4-7 (8) μm . En los cultivos más viejos, especialmente de MEA, se observan ascomas cleistoteciales, 76-115 μm diámetro; ascos 8-esporados, (7) 9-12 μm diámetro; ascosporas elipsoidales, lisas, 4-5 x 3-5 μm . De acuerdo al protocolo de Klich (2002): colonias luego de 7 días de incubación, en mm: CYA 25°C: 15-25; MEA (con peptona): 11-23; CYA 37°C: 0, sin crecimiento; CZ: 08-24.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 35,68" S 58° 29' 3,72" O (**Sitio A-A1**), 18-V-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4337); ídem, 34° 39' 27,30" S 58° 29' 14,03" O (**Sitio C-C4**), 21-XI-2011 (BAFCcult 4411).

Notas: *Aspergillus reptans* (sinónimo *Aspergillus repens* (Corda) Sacc.) es una especie cosmopolita, muy común en alimentos (Pitt & Hocking, 1997). Citado previamente para la Argentina (Magnoli *et al.*, 1998). Ha sido reportado como endofito de corteza de *Taxus cuspidata* (Yong *et al.*, 2003).

Aspergillus ustus (Bainier) Thom & Church, *The Aspergilli*: 152 (1926) (Fig. 32L-M)

Clase Eurotiomycetidae

Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Descripción: ver Klich (2002).

Colonias grisáceas en CYA y MEA, blancas a amarillentas en CZ. En CYA a 25°C con presencia de exudados. Vesículas biseriadas, (7) 10-20 (23) μm diámetro; pie 4-7 μm ancho, castaño en la madurez; fálides (4.5) 5-6 (7) x 3 (4) μm ., métulas 3-6 x 3-3,5 μm , a veces con 1-2 septos. Conidios globosos, rugosos, 4-5 (5,5) μm diámetro. De acuerdo al protocolo de Klich (2002): colonias luego de 7 días de incubación, en mm: CYA 25°C: 35-42; MEA: 35-41; CYA 37°C: 37-44; CZ: 18-26.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 16-XI-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4323).

Notas: *Aspergillus ustus* se encuentra presente en muchos suelos, pero en baja frecuencia, predominantemente en áreas tropicales y de temperatura cálida. Aunque es una especie poco común, ha sido aislada de alimentos y ambientes internos (Klich, 2002). Fue citado previamente para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009). *Aspergillus ustus* ha sido reportado como endofito de raíz en ambientes mediterráneos (Maciá-Vicente *et al.*, 2008) y como endofito de *Bouteloua eriopoda* (gramínea) micropropagada (Lucero *et al.*, 2008).

Bipolaris australiensis (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama, *Mycologia* 73: 90 (1981) (Fig. 32N-Ñ)

Clase Pleosporomycetidae

Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

Descripción: ver Ellis (1971) y Watanabe (2002).

Colonia gris a castaño muy oscuro, aterciopelada. Hifas pálidas a castaño oscuras, lisas, septadas, (1,5) 3-4 (4,5) µm. Conidióforos solitarios septados, (2) 3-6 µm ancho. Conidios rectos, elipsoidales u oblongos, redondeados en los extremos, castaño pálido a castaño rojizo, generalmente con 3, a veces con 4 o 5, pseudoseptos, 11-31 x 7-11,5 µm.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 6' 38,90" O (**Sitio D**), 16-V-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4319); ídem, 16-V-2011 (BAFCcult 4324); ídem, 16-V-2011 (BAFCcult 4332); ídem, 16-V-2011 (BAFCcult 4338); ídem, 34° 39' 28,45" S 58° 29' 6,79" O (**Sitio A-A5**), 1-VI-2010 (BAFCcult 4330).

Notas: El género *Bipolaris* ha sido reportado como endofito de madera en *Prumnopitys andina* (Oses *et al.*, 2008). No se han encontrado reportes de *B. australiensis* como endofito de madera. Se encuentra presente en Argentina (Mangiaterra *et al.*, 2006).

Chaetomium funicola Cooke, *Grevillea* 1(11): 176 (1873) (Fig. 33A-B)

Clase Sordariomycetidae

Orden Sordariales

Familia Chaetomiaceae

Descripción: ver Von Arx *et al.* (1986) y Domsch *et al.* (2007).

Ascoma castaño oscuro, globoso a elipsoidal, 55-115 x 55-105 μm . Pelos laterales castaño-oliva oscuros, 4-5 (6) μm . de ancho, con los extremos hialinos, de dos tipos: (a) sin ramificaciones, largos y derechos, con extremos romo, (b) más cortos, ramificados dicotómicamente en ángulos agudos, extremos redondeados. Debido a la presencia de dos tipos de pelos la longitud de los mismos varía entre 65-150 μm . Ascosporas claviformes, ascosporas de color oliva claro, oval o con forma de limón, 6-7 (8) x 4-5,5 μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 28,45" S 58° 29' 6,79" O (**Sitio C-C5**), 14-XI-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4389).

Notas: Si bien los ascomas encontrados en nuestra cepa eran en general más pequeños, o hacia el extremo inferior, que en la descripción de Domsch *et al.* (2007), la morfología de los pelos laterales es característica de esta especie. Esta especie es cosmopolita y tiene gran presencia en papel, restos vegetales, madera y suelos (Domsch *et al.*, 2007). Se lo ha reportado como endofito foliar de *Fagus sylvatica* (haya) en baja proporción (Unterseher & Schnittler, 2010), en semillas de *Eucalyptus globulus* (Lupo *et al.*, 2001) y en madera de *Fitzroya cupressoides* (gimnosperma nativa de Chile y Argentina) (Hormazabal & Piontelli, 2009). Ha sido citado previamente para la Argentina (Calviello, 1972) sobre estiércol de liebre.

Chaetomium globosum Kunze, ex Fr. *Systema Mycologicum* 3: 255 (1829) (Fig. 33C-E)

Clase Sordariomycetidae

Orden Sordariales

Familia Chaetomiaceae

Descripción: ver Von Arx *et al.* (1986) y Domsch *et al.* (2007).

Ascoma castaño muy oscuro a negro, globoso a subgloboso, 220-370 x 19-350 μm , con pared de textura intrincata. Pelos laterales oscuros, con rugosidades, con extremos más claros, 2-3 μm de ancho. Pelos terminales semejantes en contextura, color y ancho, pero más enrollados y entrelazados entre sí. Ascosporas clavadas, ascosporas con forma de limón y de color castaño oliva oscuro en la madurez, pared engrosada y con gúttulas, 9-12 x (5,5) 7- 9 (10) μm , con poro germinativo apical.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 27,30" S 58° 29' 14,03" O (**Sitio C-C4**), 14-XI-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4390).

Notas: Esta especie es la más común y extendida de las especies de *Chaetomium*. Se encuentra en restos de plantas, semillas, compost, papel y otros sustratos celulósicos. Se lo ha observado además en una gran variedad de suelos (Domsch *et al.*, 2007) y ha sido citado como huésped de *Platanus occidentalis* (Farr *et al.*, 1989). Esta especie es también causante de pudrición blanda (soft rot) en la madera (Schmidt, 2006). Novas & Carmarán (2008) reportaron a *C. globosum* como endofito foliar de *Celtis occidentalis* en la Reserva Spegazzini, Argentina y ha sido reportada como endofito de madera en muy baja frecuencia en *Vitis vinífera* (González & Tello, 2010).

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries, *Contribution to the Knowledge of the Genus Cladosporium*: 57 (1952) (Fig. 33F)

Clase Dothideomycetidae

Orden Capnodiales

Familia Davidiellaceae

Descripción: ver Ellis (1971) y Ho *et al.* (1999).

Colonias de color verde oliva o castaño oliváceo, reverso en extracto de malta de color negro verdoso. Conidióforos micro y macronematosos, 2-5 μm anchos, lisos o

verrugosos. Conidios, en general lisos, elipsoidales o con forma de limón, castaño oliva pálido, 0-septados, en ocasiones con 1 septo, 4-13 (15) x 2-5 (6) μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 28,45" S 58° 29' 6,79" O (**Sitio A-A1**), 16-VII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4333); ídem, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4334); ídem, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4335); ídem, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4336).

Notas: El género *Cladosporium* es cosmopolita, ha sido encontrado en hojas, restos de plantas, madera y otros sustratos, también es común encontrarlo en el aire, tanto de interiores como de exteriores (Seifert *et al.*, 2011). *Cladosporium cladosporioides* ha sido citado en numerosas oportunidades como endofito de hoja y corteza (Fisher *et al.*, 1994; Griffith & Boddy, 1990; Mahesh *et al.*, 2005). Existen, aunque menos numerosos, trabajos que lo citan como endofito de madera, aislado de ramas o albura (Collado *et al.*, 1999; Gazis & Chaverri, 2010; Giordano *et al.*, 2009). Esta especie por su parte esta citada como huésped de *Platanus occidentalis* (Farr *et al.*, 1989). Citado para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009).

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn, *Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg* 13(1): 127 (1933) (Fig. 33G, H)

Clase Pleosporomycetidae

Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

Descripción: ver Carmichael *et al.* (1980) y Ellis (1971).

Colonia castaño oscura, algodonosa o aterciopelada. Conidióforos solitarios o en pequeños grupos, simples o ramificados, septados, lisos. Conidios acropleurógenos, con 3 septos, lisos, curvados en la tercera célula desde la base, la cual es usualmente más larga y oscura que las demás, las células de los extremos son subhialinas o de color castaño pálido, mientras que las del medio son más oscuras, 17-32 x 8-14 μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 18-IV-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4315); ídem (**Sitio D**), 18-IV-2011 (BAFCcult 4317); ídem (**Sitio D**), 18-IV-2011 (BAFCcult 4322).

Notas: El género *Curvularia* es cosmopolita, apareciendo en muchos tipos de plantas en hojas, semillas, particularmente en pastos (Seifert *et al.*, 2011). *Curvularia lunata* ha sido citada como endofito de hoja (Kumaresan & Suryanarayanan, 2001), de tallo y corteza interna (Mahesh *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2007) y se la ha encontrado colonizando madera como endofito en baja frecuencia (Bettucci *et al.*, 1999). En Argentina se lo ha reportado como endofito de 5 cultivares de trigo (Larran *et al.*, 2007).

Epicoccum nigrum Link, *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin* 8: 32 (1816) (Fig. 33I, J)

Clase Pleosporomycetidae

Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

Descripción: ver Domsch *et al.* (2007) y Ellis (1971).

Colonia de castaño rojizo en Extracto de malta y color claro con verdoso en agar papa. Micelio principalmente sumergido y pegado al agar. Conidios subglobosos a piriformes: 20-30 (37) x 13-17 µm, verrugosos, de color castaño dorado, con septos en diferentes direcciones formando hasta 15 células. Base en forma de embudo, 2-6 (7,5) µm largo y cicatriz amplia en la zona de enganche. Células conidiógenas: 4-8 (10) µm.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 36' 52,47" S 58° 24' 14,20" O (**Sitio B-B4**), 15-V-2012, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4385).

Notas: Esta especie es cosmopolita, común en todo tipo de plantas, especialmente en hojas. Ha sido también aislada de aire, animales, textiles y alimentos (Ellis, 1971). Ha sido previamente citada para Argentina (Mielnichuk & Lopez, 2007). Se ha registrado

como endofito de madera en numerosos trabajos (Collado *et al.*, 1999; Bettucci *et al.*, 1999; Giordano *et al.*, 2009; González & Tello, 2010).

Fusarium solani (Mart.) Sacc., *Michelia* 2(7): 296 (1881) (Fig. 33K-M)

Clase Hypocreomycetidae

Orden Hypocreales

Familia Nectriaceae

Descripción: ver Booth (1971) y Domsch *et al.* (2007).

Colonias subhialinas a oliváceas, con micelio apretado contra el agar. Abundante producción de microconidios, (4) 9-12 x (1.5) 2-4 μm , a partir de microconidióforos elongados y solitarios, 36-60 x 2 (2.5) μm . Macroconidios tabicados, menos numerosos, 19-40 x 3-4 (5) μm , a partir de macroconidióforos 19-37 x (2,5) 2 (4) μm , desarrollándose en los laterales de las hifas.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 21-II-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4321).

Notas: *Fusarium* es un género cosmopolita presente en una gran variedad de plantas, suelo, líquenes, basura, y hasta en algunos animales, inclusive humanos (Seifert *et al.*, 2011). Ha sido citado como endofito de madera por de Errasti *et al.* (2010), con aislamientos a partir de *Broussonetia papyrifera*, de la Reserva Dr. Carlos Spegazzini, Argentina. Particularmente *Fusarium lateritium* se encontró colonizando tanto *B. papyrifera* como *Ligustrum lucidum*, aunque este último en menor frecuencia. También ha sido citado como endofito de la corteza interna y tejido xilemático de diversas especies de árboles como *Prosopis cineraria* o *Eucalyptus* sp. (Bettucci *et al.*, 1999; Gehlot *et al.*, 2008). La especie *Fusarium solani* ha sido encontrada en asociación con canchros en diversos árboles. Pilotti *et al.* (2002) lo aislaron a partir de canchros abiertos perennes y a partir de tests de patogenicidad determinaron dos variedades de *F. solani* causantes de estos desordenes en *Platanus acerifolia*. No se han encontrado registros de esta especie fúngica como endofito. Citada previamente para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009).

Gliocladium penicillioides Corda, *Icones fungorum hucusque cognitorum* 4: 31, t. 7:92 (1840) (Fig. 33N-O)

Clase Hypocreomycetidae

Orden Hypocreales

Familia Hypocreaceae

Descripción: ver Domsch *et al.* (2007).

Colonia de color amarillo pálido. Conidióforos densamente peniciliados, 8-13 x 2-3 µm. Conidios simétricos, lisos, hialinos: 4-6 x 2-3 µm, agrupados en mucílago en el extremo de los conidióforos. Células conidiógenas tipo fialídicas: 8-11 (19) x 2 (2,5) µm. Presencia de agrupación de hifas, semejando una especie de sinema, 87,5 µm de grosor, fértil prácticamente en toda su extensión.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 21-II-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4313), ídem, 28-II-2011 (BAFCcult 4318).

Notas: Según Seifert (1985) *G. penicillioides* no forma sinemas en el sustrato natural. Aunque se describen 3 especies más que lo forman, nuestros aislamientos no corresponden a ninguna de estas especies. Según la clave de Domsch *et al.* (2007), las medidas de los aislamientos de este trabajo corresponderían a esta especie. *Gliocladium penicillioides* ha sido reportado como endofito de madera en el árbol de la India, *Terminalia arjuna* (Tejesvi *et al.*, 2005) y en *Fagus sylvatica* (Baum *et al.*, 2003). Citado previamente para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009).

Nodulisporium Preuss, *Klotzschii Herbarium Vivum Mycologicum, Editio novo. Century* no. 1272 (1849) (Fig. 34A-B)

Clase Xylariomycetidae

Orden Xylariales

Familia Xylariaceae

Descripción: ver Greenhalgh & Chesters (1968) y Carmichael *et al.* (1980).

Colonia aterciopelada, gris en un principio, oscureciéndose con el correr de los días hasta ser muy oscura, casi negra. Conidióforos macronematosos, lisos o con pequeñas verrugas. Células conidiógenas poliblasticas, 2-3 µm ancho, solitarias o peniciladas, simpodiales, cilíndricas a clavadas, denticuladas, dentículos generalmente muy cortos y frágiles, extremos como cabezuelas de 3-5 µm ancho. Conidios lisos, solitarios, acropleurógenos, unicelulares, elipsoides u obovoides, truncados en la base, hialinos o castaños oliváceos, (3,5) 4-6 (9) x 2-3,5 µm.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O, 8-VII-2010 (**Sitio A-A3**), a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4384); ídem, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 8-VII-2010 (BAFCcult 4409); ídem, 34° 34' 47,62" S 58° 28' 53,58" O (**Sitio A-A2**), 8-VII-2010 (BAFCcult 4410); ídem, 34° 34' 35,68" S 58° 29' 3,72" O (**Sitio A-A1**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4416).

Notas: Este género es anamorfo de géneros de la familia Xylariaceae, como *Daldinia* e *Hypoxylon*. Cosmopolita, encontrándose principalmente sobre madera (Seifert *et al.*, 2011). En Argentina de Errasti *et al.* (2010) lo encontró en la corteza interna y superficial de *Broussonetia papyrifera*, pero no así como endofito. En Europa se lo ha reportado como endofito de hoja de ejemplares de la familia Cupressaceae (Petrini & Carroll, 1981), además como endofito de hoja y de ramas de *Quercus ilex*, en este último caso como anamorfo de *Hypoxylon fragiforme* (Fisher *et al.*, 1994). Griffith & Boddy (1990) aislaron cepas de *Daldinia* sp. de corteza sana de haya (*Fagus sylvatica*) y roble (*Quercus robur*). Petrini & Fisher (1990) detectaron cepas endofíticas de *Daldinia* (teleomorfo) en corteza y xilema de *Salix fragilis*, sauce conocido como “mimbrera”. Más recientemente, Parfitt *et al.* (2010) detectaron ADN identificado como de *Daldinia concentrica* en albura sana de 11 especies de árboles. Gazis & Chaverri (2010) registraron a *Entonaema pallida* en *Hevea brasiliensis* como endofito de hoja y albura, aunque en baja frecuencia. *Nodulisporium* sp. ha sido registrado como endofito de madera de *Abies beshanzuensis* (Yuan *et al.*, 2011).

Pestalotiopsis guepinii (Desm.) Steyaert, *Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles* 19(3): 312 (1949) (Fig. 34C-D)

Clase Xylariomycetidae

Orden Xylariales

Familia Amphisphaeriaceae

Descripción: ver Sutton (1961).

Conidioma hasta 200 μ diámetro. Conidióforos: 1-3 (4) μ m ancho. Conidios: 18-36 x (5) 6-7 (8) μ m, lisos: células del centro castañas, concoloras, 13-16 μ m de largo: apéndices apicales 2-5, generalmente 3, sin ramificación, ápices obtusos, 10-20 μ m de largo; apéndice basal 2-7 μ m de largo.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,62"S 58° 28' 53,58" O (**Sitio A-A2**), 20-X-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4311); ídem, 34° 34' 47,85"S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 20-V-2010 (BAFCcult 4314).

Notas: Las especies de *Pestalotiopsis* son comunes en ecosistemas templados y tropicales. Pueden causar enfermedades, aunque también se lo puede encontrar como saprobios o endofitos (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). En Sudamérica se ha encontrado a *P. guepinii* colonizando xilema y corteza sana de *Eucalyptus grandis* (Bettucci *et al.*, 1999) en baja frecuencia, también presente en partes sintomáticas. Citada anteriormente para la Argentina por Allegrucci *et al.* (2009).

Phialemonium curvatum W. Gams & W.B. Cooke, *Mycologia* 75: 980 (1983) (Fig. 34E-F)

Clase Sordariomycetidae

Orden Sordariales

Familia Cephalothecaceae

Descripción: ver Gams & McGinnis (1983).

Colonias grisáceas en APG y castaño más oscuro en MEA 2%. Micelio mayormente sumergido o apretado contra el agar, hifas 1-3 μ m ancho. Adelofíalides (sin septo basal) abundantes, con collaretes poco visibles, ya sea como proyecciones laterales cortas, 1,5-

8 (21) x (0,5) 1-1,5 μm , que dan origen a conidios hialinos, aseptados, de paredes delgadas, cilíndricos a alantoides, 6-9 x 2-3,5 μm ; o a partir de conidióforos agrupados, ramificados irregularmente, con adelofálides de 7-10 x 1-2 μm . Conidios hialinos, sin septo, lisos y elipsoidales pero más pequeños: (2,5) 3-4 x 1-1,5 μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 28,45" S 58° 29' 6,79" O (**Sitio C-C5**), 4-XI-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4381).

Notas: Los caracteres microscópicos coinciden con los descriptos para esta especie, aunque los conidios presentan un rango más amplio de tamaño, llegando a valores superiores de ancho (3,5 μm , contra los 2 μm de la descripción original). El género *Phialemonium* se encuentra en madera, animales, agua y suelo, con distribución en África, Europa, Norteamérica y Sudamérica (Seifert *et al.*, 2011). *Phialemonium curvatum* ha sido encontrado, en baja frecuencia, como endofito de muestras de madera y corteza de *Quercus ilex* (Collado *et al.*, 1999) y madera de *Pinus sylvestris* (Giordano *et al.*, 2009). No hay citas previas de esta especie para Argentina.

***Phoma eupyrena* Sacc., *Michelia* 1(5): 525 (1879) (Fig. 34G-I)**

Clase Pleosporomycetidae

Orden Pleosporales

Familia Incertae sedis

Descripción: ver Morgan-Jones & Burch (1988).

Colonia castaño muy oscuro. Picnidios esféricos a subesféricos, con un cuello corto, oscuro, hasta 400 μm diámetro. Conidios (3) 4-5 x 2 μm , cilíndricos o elipsoidales, mayormente rectos, hialinos. Clamidosporas castaño claras, de pared lisas, terminales o intercalares, con frecuencia en cadenas, 8-11 (12) x (6) 7-8 (11) μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 21-II-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4385).

Notas: *Phoma eupyrena* es un hongo muy frecuente en suelos, cosmopolita y con un amplio rango de hospedantes. Se lo suele considerar un invasor secundario de tejidos vegetales, aunque se lo asocia a necrosis superficial de tubérculos de papa y damping-off de varias especies (Morgan-Jones & Burch, 1988). Citado previamente para la Argentina (Esquivel *et al.*, 2003). Ha sido encontrado como endofito de madera en pino (Giordano *et al.*, 2009).

Phomopsis archeri B. Sutton, *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata* 571 (1980) (Fig. 34J-L)

Clase Sordariomycetidae

Orden Diaporthales

Familia Diaporthaceae

Descripción: ver Sutton (1980).

Conidioma de hasta 1 mm diámetro, globoso o subgloboso. Conidióforos escasamente septados y ramificado, filiformes. Conidios: α -conidios elipsoidales, 0-2 gutulados, 7-9 (9,5) x 2-3 μm ; β -conidios filiformes, curvados en el extremo, 21-33 x 1 (1,5) μm . La cepa estudiada presenta β -conidios ligeramente más largos que los descriptos por Sutton (1980): 15-19 μm de largo.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 28-II-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4320).

Notas: *Phomopsis* es un importante género de hongos fitopatógenos con una amplia diversidad de hospedantes. Las especies de *Phomopsis* se han reportado también como endofitos, saprobios y hasta causantes de enfermedades en humanos y otros mamíferos (Udayanga *et al.*, 2011). Las especies de este género prevalecen como endofitos en muchos hospedantes de regiones templadas y tropicales, especialmente en angiospermas, a partir de hojas (Murali *et al.*, 2006; Promputtha *et al.*, 2005) o ramas pequeñas (Tomita, 2003). *Phomopsis archeri* fue descripto inicialmente sobre el género de fanerógamas *Pittosporum* (Farr *et al.*, 1989), sin embargo, se lo ha encontrado como

endofito de corteza del pino de China *Pinus tabulaeformis* (Guo *et al.*, 2008) y del cactus *Opuntia ficus-indica* de Brasil (Bezerra *et al.*, 2012). Se lo ha reportado como endofito de madera en *Acer truncatum* (Sun *et al.*, 2011). No existen citas previas de esta especie en Argentina.

Pseudallescheria boydii (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello, *Mycotaxon* 14(1): 97 (1982) (Fig. 35A-E)

Clase Hypocreomycetidae

Orden Microascales

Familia Microascaceae

Descripción: ver Cortez *et al.* (2008).

Se observaron dos tipos de formas anamórficas en la misma colonia. Anamorfo tipo *Scedosporium*: con hifas hialinas septados cilíndricas (2-4 µm diámetro). Células conidiógenas (1,5-2,5 µm) anelídicas, conidios ovales (4-7 x 3-5 µm). Anamorfo tipo *Graphium*: con paquetes de hifas erectas, castaño-oliva, terminando en un cepillo de células conidiógenas delgadas. Sinema: 40-80 x 5-26 µm. Células del sinema: 22-36 (50) x 1,5-2,5 µm. La conidiogénesis es similar al tipo *Scedosporium*, células conidiógenas: 1-2 µm de ancho. Conidios: 4-12 x 2,5-4 µm.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,62" S 58° 28' 53,58" O (**Sitio A-A2**), 16-VII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4326); ídem, 16-VII-2010 (BAFCcult 4327).

Notas: Se detectaron ambos anamorfos en cultivo: *S. apiospermum* y *Graphium*, identificado como *Graphium putredinis* (Ellis, 1971). Geldenhuis *et al.* (2004), a través de estudios moleculares mostraron la relación entre el teleomorfo y este anamorfo. *Pseudallescheria boydii* es un hongo ubicuo presente en suelo, aguas contaminadas y residuales. Tiene importancia médica (Cortez *et al.*, 2008). Ha sido citado para la Argentina como patógeno oportunista en humanos (Bonduel *et al.*, 2001). No se han encontrado registros de esta especie como endofito.

Sarocladium strictum (W. Gams) Summerbell, *Studies in Mycology* 68: 158 (2011) (Fig. 35F)

Clase Hypocreomycetidae

Orden Hypocreales

Familia Incertae sedis

Descripción: ver Domsch *et al.* (2007).

Colonia de color rosáceo, de aspecto húmedo o baboso. Conidios cilíndricos: (3) 4-5 (5,5) x 1-1,5 μm . Células conidiógenas fialídicas solitarias: 14-42 x 1-1,5 μm , hialinas.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 28,33" S 58° 29' 27,65" O (**Sitio C-C3**), 8-VIII-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4316).

Notas: *Sarocladium strictum* (sinónimo: *Acremonium strictum*) es un hongo común que parece tener una amplia variedad de estrategias ecológicas, aun el ser un patógeno oportunista en humanos y otros mamíferos (Arnold, 2007). Citado previamente para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009). Citado previamente como endofito de madera en diversos hospedantes (González & Tello, 2010; Giordano *et al.*, 2009; Hormazabal & Piontelli, 2009).

Trichoderma atroviride P. Karst., *Finlands Mögelsvampar*: 21 (1892) (Fig. 35G)

Clase Hypocreomycetidae

Orden Hypocreales

Familia Hypocreaceae

Descripción: ver Gams & Bisset (1998) y Samuels *et al.* (2012).

Colonias con un fuerte olor a coco. Conidióforos 2-3,5 μm ancho, con ramificaciones generalmente unilaterales. Fialides 5-9 (10) x 2-4 μm ; 1-2 μm ancho en la base, en verticilos de 2-4, con frecuencia solitarios. Conidios verdes, subglobosos a ovoidales, lisos, 3-4 (5) μm diámetro. Clamidosporas abundantes, globosas a subglobosas, terminales o intercalares, (8) 9-11 (13) μm diámetro.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 10-V-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4375); ídem, 10-V-2011 (BAFCcult 4376); ídem, 10-V-2011 (BAFCcult 4377); ídem 10-V-2011 (BAFCcult 4378); ídem, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 16-VII-2010 (BAFCcult 4382).

Notas: *Trichoderma* es un género común en suelos. Debido a su profusa esporulación son ampliamente registrados en toda clase de estudios. Tienen en general un mínimo de requerimientos nutricionales y pueden crecer rápidamente, además de producir metabolitos secundarios. Poseen además la capacidad de transformar una extraordinaria variedad de materiales orgánicos tanto de origen natural como xenobióticos. Son conocidos hiperproductores de enzimas incluyendo quitinasas y celulasas. Suele estudiarse sus ventajas como agentes de control biológico y estimuladores del crecimiento vegetal. También hay informes sobre infecciones de humanas causadas por *Trichoderma* (Klein & Eveleigh, 1998). Varias especies de *Trichoderma* han sido citadas como endofitos, tal es el caso de *Trichoderma viride* (Verma *et al.*, 2007), *Trichoderma* sp. (Mahesh *et al.*, 2005), *Trichoderma amazonicum* en hojas y albura de *Hevea* sp. (Chaverri *et al.*, 2011), más diversas especies de *Trichoderma* sobre madera de *Theobroma cacao* (Bailey *et al.*, 2008). En Argentina se aisló *Trichoderma koningii* como endofito de madera de ejemplares de *Ligustrum lucidum*, mientras que *Trichoderma hamatum* se obtuvo en el interior de la corteza de este árbol (de Errasti *et al.*, 2010). *Trichoderma atroviride* ha sido citado previamente como endofito de madera en pino (Giordano *et al.*, 2009). Citado previamente para la Argentina (Capdet, 2012).

Trichoderma harzianum Rifai, *Mycological Papers* 116: 38 (1969) (Fig. 35H, I)

Clase Hypocreomycetidae

Orden Hypocreales

Familia Hypocreaceae

Descripción: ver Gams & Bisset (1998) y Samuels *et al.* (2012).

Conidióforos 3-4 (5) µm ancho, con ramificaciones generalmente unilaterales. Fiálides 5-8 (12) x 2-4 (5) µm; 1-3 µm ancho en la base. Conidios verdes, subglobosos a

ovoidales, lisos, 3-4 (5) x 2-4 (5) μm diámetro. Clamidosporas globosas a subglobosas, terminales o intercalares, 5-10 x 6-11 (12) μm , infrecuentes.

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 35,68" S 58° 29' 3,72" O (**Sitio A-A1**), 16-VII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4380); ídem, 34° 34' 47,62" S 58° 28' 53,58" O (**Sitio A-A2**), 16-VII-2010 (BAFCcult 4386); ídem, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 21-II-2011 (BAFCcult 4388); ídem, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**SitioA-A4**), 16-VII-2010 (BAFCcult 4414).

Notas: *Trichoderma harzianum* ha sido citado previamente como endofito de la corteza interna de *Prosopis* (Gehlot *et al.*, 2008) y endofito de madera en *Hevea brasiliensis* y *Vitis vinífera* (Gazis & Chaverri, 2010; González & Tello, 20010) Citado previamente para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009)

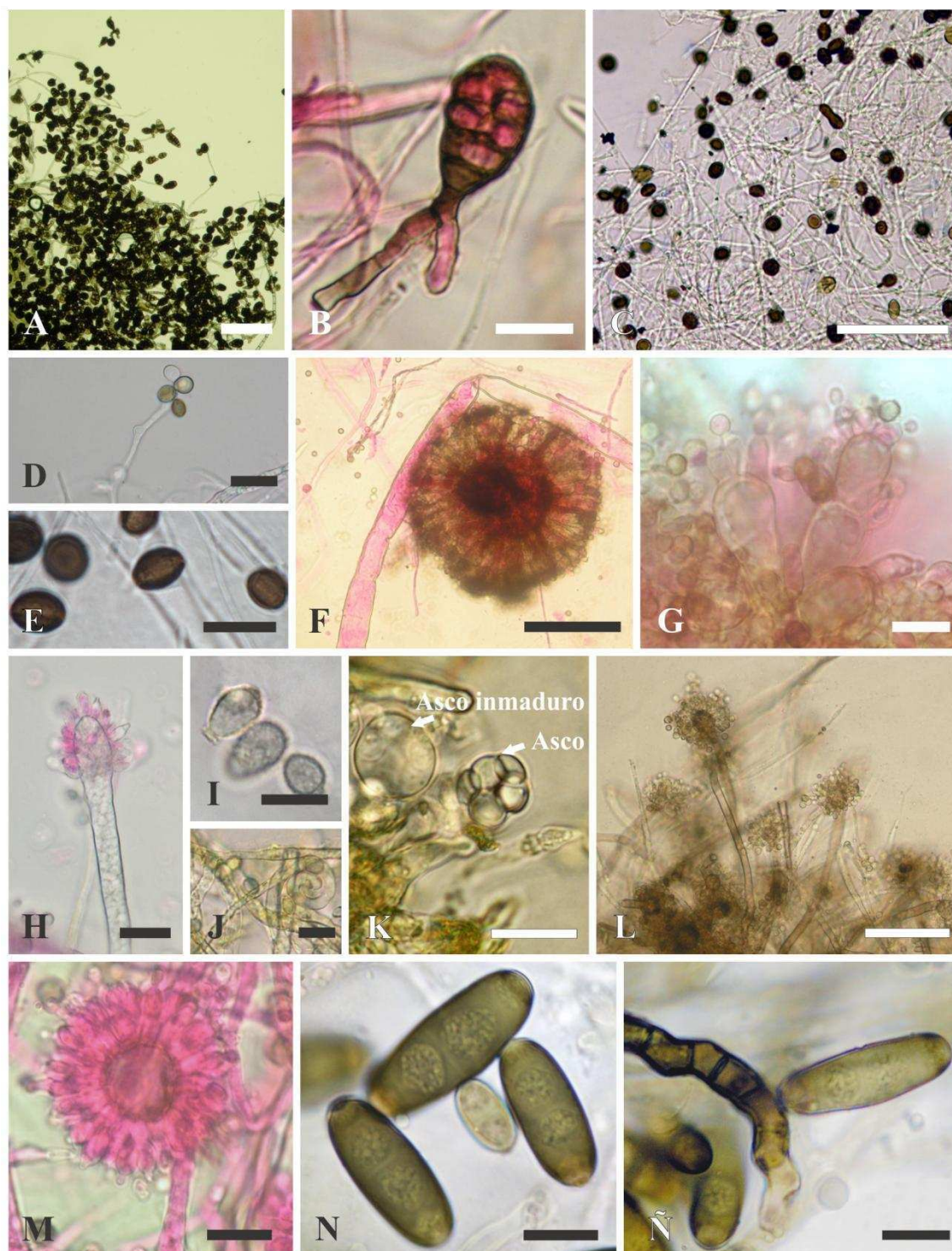


Figura 32: *Alternaria alternata*. (A) Micelio y masa de conidios, (B) conidio. ***Arthrrium phaeospermum*.** (C) Micelio con conidios, (D) conidios en formación, (E) conidios. ***Aspergillus niger*.** (F) Conidióforo y conidios, (G) métulas con fiálides. ***Aspergillus reptans*.** (H) Conidióforo con fiálides, (I) conidios, (J) hifas enrolladas, (K) ascos con ascosporas. ***Aspergillus ustus*.** (L) Conidióforos, (M) conidióforo y fiálides. ***Bipolaris australiensis*.** (N) Conidios, (Ñ) Conidióforos con conidio. Escala: 10 µm en B, E, G, H, I, K, M, N, Ñ; 20 µm en D, J; 50 µm en C, F, L; 100 µm en A.

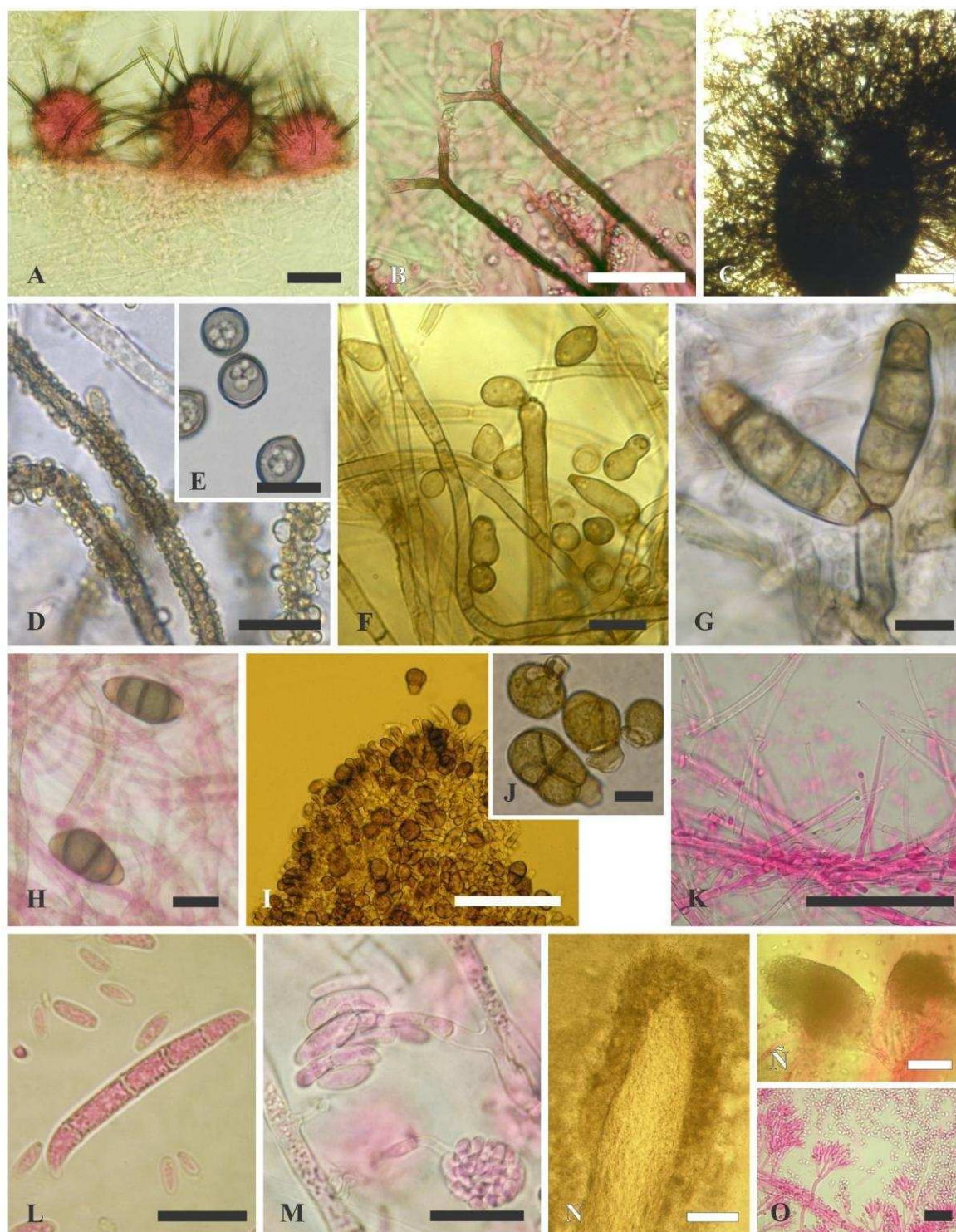


Figura 33: *Chaetomium funicola*. (A) Ascomas, (B) pelos peridiales con ramificaciones. *Chaetomium globosum* (C) Ascoma, (D) pelos peridiales, (E) ascosporas. *Cladosporium cladosporioides* (F) Conidióforo y conidios. *Curvularia lunata* (G) Conidióforo con conidios, (H) conidios. *Epicoccum nigrum* (I) Conidióforos con conidios en formación, (J) conidios. *Fusarium solani* (K) Macroconidióforos, (L) microconidióforos, (M) macroconidio y microconidios. *Gliocladium penicillioides* (N) Hifas agrupadas, tipo sinema, (Ñ) conidióforos con masa de esporas, (O) conidióforos peniciliados y conidios. Escalas: 10 μm en D, E, F, G, J, L, M; 20 μm en H; 50 μm en B, Ñ, O; 100 μm en A, C, I, K; 500 μm en N.

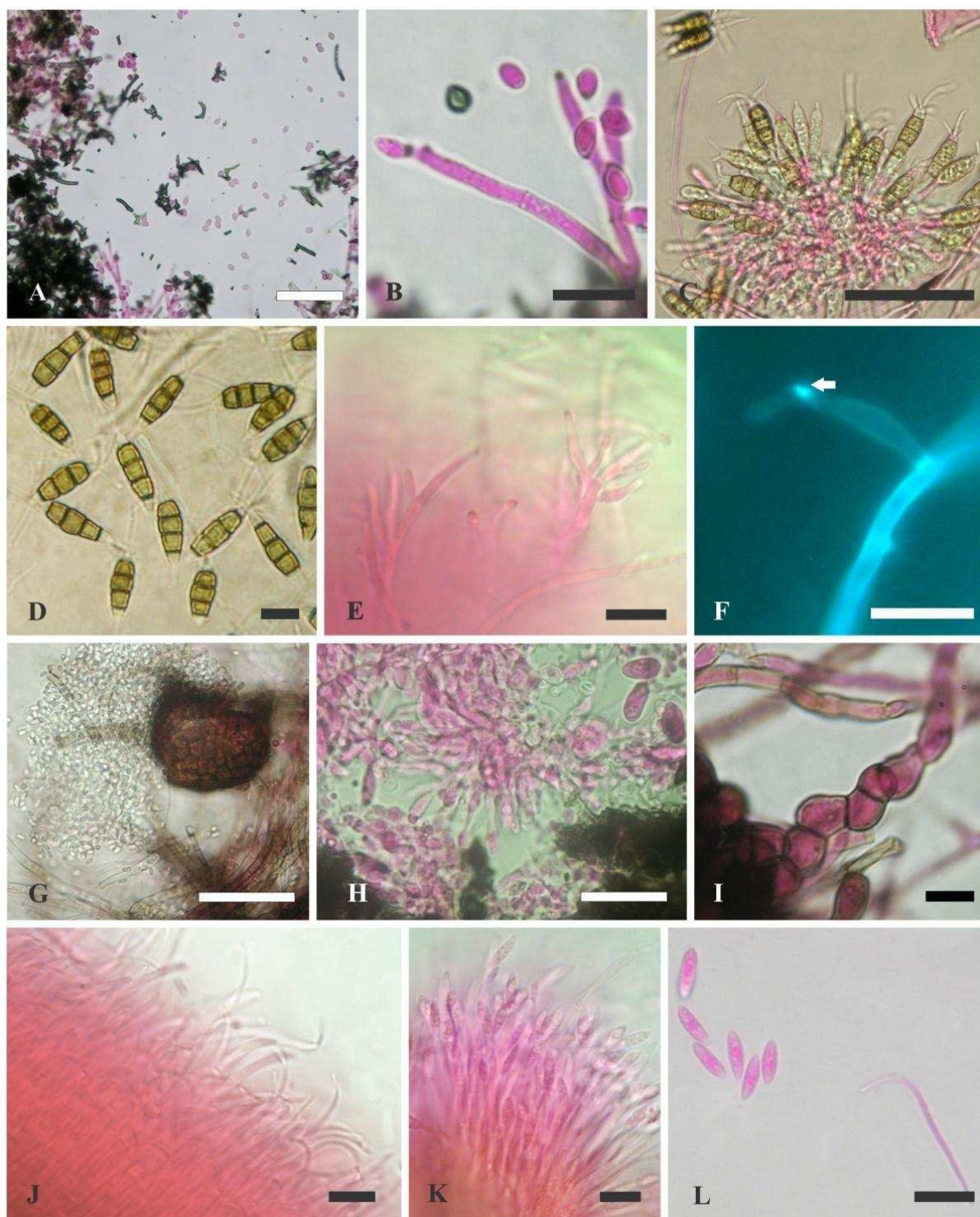


Figura 34: *Nodulisporium* sp. (A) Micelio melanizado y conidióforos, (B) conidióforos y conidios. *Pestalotiopsis guepinii* (C) Conidios en formación, (D) conidios. *Phialemonium curvatum* (E) Conidióforos y células conidiógenas, (F) conidios en formación con collar (flecha) en calcoflúor. *Phoma eupyrena* (G) Conidioma picnidial con masa de conidios, (H) conidios en formación, (I) clamidosporas. *Phomopsis archeri* (J) Formación de β -conidios filiformes, (K) formación de α -conidios, (L) conidios β y α maduros. Escalas: 10 μ m en B, D, E, F, H, I, J, K, L; 50 μ m en C, G; 100 μ m en A.

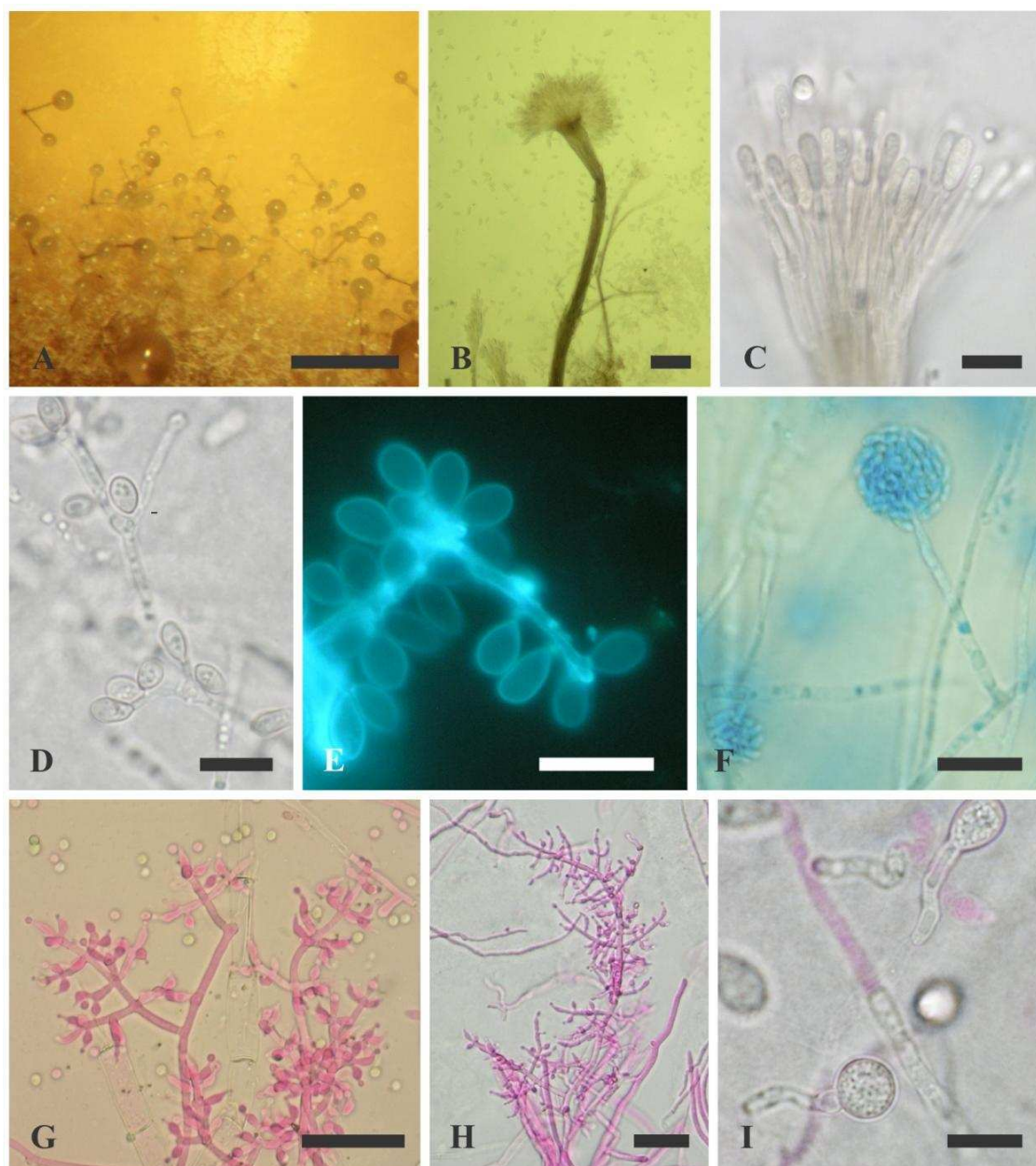


Figura 35: *Pseudallescheria boydii* (A) Sinemas a lupa, (B) sinemas, (C) conidióforos y conidios en formación, (D-E) anamorfo *Scedosporium*: conidióforos y conidios en formación. *Sarocladium strictum* (F) Conidióforos y conidios. *Trichoderma atroviride* (G) Conidióforos. *Trichoderma harzianum* (H) Conidióforos, (I) clamidosporas. Escalas: 10 μm en C, D, E, F, I; 50 μm en B, G, H; 1 mm en A.

2.2. Especies de basidiomicetes: endofitos y patógenos

Coprinellus micaceus (Bull.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson, *Taxon* 50(1): 234 (2001) (Fig. 36)

Clase Agaricomycetidae

Orden Agaricales

Familia Psathyrellaceae

Descripción: ver Robles *et al.* (2011).

Clave patrón: 1.3.11.16. 25. (26).32.37.39.42.53

Según clave desarrollada por Deschamps & Wright (1975).

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 8-VII-2010, a partir de madera sintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4306); ídem, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 14-V-2010 (BAFCcult 4307); ídem, 34° 39' 28,33" S 58° 29' 27,65" O (**Sitio C-C3**), 8-VIII-2011 (BAFCcult 4308); ídem, 34° 34' 35,68" S 58° 29' 3,72" O (**Sitio A-A1**), 8-VII-2010 (BAFCcult 4309); ídem, 34° 35' 10,26" S 58° 28' 55,96" O (**Sitio A-A5**), 14-V-2010 (BAFCcult 4310).

Tipo de pudrición: No hay registros de que cause pudrición en la madera. No produce una disminución significativa en la madera de *P. acerifolia* (Robles *et al.*, 2011).

Observaciones: El estudio coincide con las descripciones Robles *et al.* (2011) sobre *P. acerifolia* de la Ciudad de Buenos Aires, sin embargo no se observaron estructuras globosas en los cultivos.

Notas: Esta especie es de distribución cosmopolita, hábito saprofítico y ya ha sido citada para la Argentina (Robles *et al.*, 2011; Wright & Albertó, 2002). De Errasti *et al.* (2010) lo hallaron como endofito de madera en *Broussonetia papyrifera* y *Celtis occidentalis*.

Coprinopsis cinerea (Schaeff.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo, *Taxon* 50(1): 227 (2001) (Fig. 37)

Clase Agaricomycetidae

Orden Agaricales

Familia Psathyrellaceae

Descripción:

Caracteres macroscópicos: Crecimiento lento, cubre la caja a la quinta semana. Micelio blanco, hialino, con textura algodonosa laxa. A partir de la segunda semana comienzan a observarse pequeños esclerocios más cercanos a la zona del inóculo, frecuentemente rodeados por gotas, lo que les da un aspecto brillante. Ya en la cuarta semana, los esclerocios son más abundantes y forman como un anillo en la zona de la mitad de la colonia. Borde regular. Reverso inalterado. Sin olor característico.

Caracteres microscópicos: Micelio aéreo: 1) hifas hialinas, con septos simples en su gran mayoría, muy escasas fibulas, teñibles con floxina, (2-4 (4,5)) μm de diámetro. 2) Ya desde la primera semana se observan abundantes artrosporas 4-6 (7,5) x 1,5-2 μm a partir de células de 13-25 x 2-4 μm . 3) En la primera semana, en algunos cultivos, se observan células ensanchadas que serían los primordios de los esclerocios. A partir de la segunda semana los esclerocios son cada vez más abundantes: 140-170 (200) x 130-150 (180) μm . Las células de la pared del esclerocio son de color castaño oscuro formando como un rompecabezas: 8-15 x 5-8 (10) μm . Las células del interior del esclerocio también son irregulares y se agrupan tipo rompecabezas pero son hialinas y de mayor tamaño: 19-41 x 4-10 μm . 4) En la cuarta semana se comienzan a ver clamidosporas, escasas, cerca de la zona del esclerocio o dentro de este: 10-22 x 6-12 μm . Micelio sumergido: se observan hifas más finas y retorcidas 1,5-3 (3,5) μm . Si bien se observan artrosporas sueltas, no se observan en formación. También hay primordios de esclerocios.

Clave patrón: 1 (2). 6. 23. 35. 36. 38. 45. 53

Según clave desarrollada por Deschamps & Wright (1975).

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 35' 10,26" S 58° 28' 55,96" O (**Sitio A-A5**), 4-VI-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4361).

Tipo de pudrición: Es un hongo considerado saprófito. Los estudios sobre las enzimas extracelulares (peroxidasas y lacasas) de *C. cinerea*, las diferencian de las enzimas

típicas de hongos de pudrición por tener mayor amplitud de especificidad de sustrato y por la arquitectura de sus sitios activos (Heizkill *et al.*, 1998; Hoegger *et al.*, 2004).

Observaciones: El estudio de cultivos describe la forma anamórfica de *Coprinopsis cinerea*: *Hormographiella aspergillata* Guarro, Gené & De Vroey. No se han encontrado registros de estudios de Nobles para esta especie, sin embargo la fase anamórfica *H. aspergillata* aparece documentada en la descripción original de Guarro *et al.* (1992) y posteriores trabajos (Kües, 2000).

Notas: *C. cinerea* es un hongo cosmopolita asociado a compost y aguas residuales (Seifert *et al.*, 2011), estiércol y chips de madera (Keirle *et al.*, 2004). En algunos casos se lo ha encontrado asociado a problemas médicos en humanos (Suarez *et al.*, 2011; Verweij *et al.*, 1997). Kües (2000) indica que la formación de esclerocios no deriva en la formación del basidioma. La falta de fíbulas en el micelio indica que se trataría del monocarionte. Por mucho tiempo se pensó que solamente el monocarionte podía formar artrosporas pero ahora se han encontrado casos en donde el dicarionte también presenta este tipo de reproducción asexual, bajo ciertas condiciones controladas. Esta es la primera cita de esta especie para la Argentina y el primer reporte sobre *Platanus acerifolia*. No se han encontrado reportes de esta especie como endofito.

Granulobasidium vellereum (Ellis & Cragin) Jülich, *Persoonia* 10(3): 328 (1979) (Fig. 38)

Clase Agaricomycetidae

Orden Agaricales

Familia Cyphellaceae

Descripción:

Caracteres macroscópicos: Presenta un crecimiento rápido, cubriendo la caja al término de la segunda semana. Micelio en un principio hialino, sin embargo, a partir de la cuarta semana este presenta un color levemente crémeo, en especial cerca del inóculo. Micelio al principio algodonoso, bastante aéreo, sobre todo hacia el centro de la colonia, en el borde de la colonia las hifas están en mayor contacto con el agar. Ya a partir de la

segunda semana, la gran cantidad de clamidosporas presentes les da un aspecto pulverulento, bastante laxo, hasta ser escaso el micelio restante y las clamidosporas forman prácticamente todo el micelio aéreo. En algunos cultivos se forman pequeños cúmulos de clamidosporas que sobresalen del resto de la colonia. Margen regular. Reverso inalterado a lo largo del estudio. No se detectó olor característico.

Caracteres microscópicos: hifas fibuladas, hialinas, con pared delgada, teñibles con floxina, 2-4 μm de diámetro; clamidosporas abundantes, terminales e intercalares, con forma de limón y/o globosas. Estas aparecen a partir de la primera semana en toda la caja, 6-11 x 6-9 μm , con paredes de entre 1-2 μm de espesor. El micelio sumergido presenta los mismos elementos que el micelio aéreo, hifas generativas: 2-4 μm de diámetro, clamidosporas: 6-10 x 5-8 μm .

Clave patrón: 1. 3. 7. 34. 36. 38. 42. 51. 54. 60

Según clave desarrollada por Deschamps & Wright (1975).

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 16-VII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4362); ídem 34° 34' 47,62" S 58° 28' 53,58" O (**Sitio A-A2**), 16-VII-2010 (BAFCcult 4363); ídem (**Sitio A-A2**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4364); ídem, 34° 34' 35,68" S 58° 29' 3,72" O (**Sitio A-A1**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4365); ídem, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4366); ídem, 34° 35' 10,26" S 58° 28' 55,96" O (**Sitio A-A5**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4367).

Tipo de pudrición: asociada a pudrición blanca, sobre angiospermas (Stalpers, 1978). A pesar de que no produce reacción de oxidasas, algo propio de los hongos de pudrición castaña, se lo ha encontrado a partir de madera con signos de pudrición blanca (Nobles & Nordin, 1955). Según Nakasone (1990) *Hypochnicium vellereum* se asocia con una podredumbre blanca de tocones y árboles vivos, ambos pertenecientes a angiospermas.

Observaciones: la descripción coincide con la realizada por Nobles & Nordin (1955) y Stalpers (1978). En ella se observa que muchas veces en el cultivo aparecen

fructificaciones antes de la sexta semana. Esto no se observó en ninguno de los cultivos de este trabajo.

Notas: Es una especie común en Europa, particularmente en Italia. Se asocia a *Ulmus* sp., aunque se lo ha citado sobre otras angiospermas (Bernicchia *et al.*, 2007). En Sudamérica ha sido citado para Brasil (Ramos Bononi *et al.*, 2008). No se han encontrado registros de esta especie como endofito de madera, ni colonizando ejemplares de *Platanus acerifolia*. No hay registros de esta especie para Argentina, aunque existen registros para el país de especies de *Hypochnicium* (Greslebin & Rajchenberg, 2003; Lopez & Wright, 1985).

Hymenochaete Lév., *Annls Sci. Nat., Bot.*, sér. 3 5: 150 (1846) (Fig. 39)

Clase Incertae sedis

Orden Hymenochaetales

Familia Hymenochaetaceae

Descripción:

Caracteres macroscópicos: Crecimiento lento, cubre la caja a la cuarta semana. Capa miceliana al principio blanca nívea, algodonosa. A partir de la primera semana, en algunos cultivos comienzan a aparecer zonas dispersas de color castaño oscuro, muy definidas y de micelio más apretado contra el agar, de carácter crustoso. Conforme avanza el tiempo, estas zonas se hacen más extensas, aunque no llegan a cubrir toda la caja, pero en ocasiones se disponen en forma de anillos. El reverso se ve oscurecido en los sectores que corresponden a estas zonas crustosas. Borde regular, sin olor particular.

Caracteres microscópicos: Micelio aéreo: Hifas con septos simples, afibuladas, hialinas, con pared delgada, teñibles con floxina, 1,5-3 μm de diámetro. El micelio sumergido presenta los mismos elementos que el micelio aéreo, hifas generativas: 2-3 μm de diámetro. Las zonas oscuras presentan hifas retorcidas formando un plencténquima como piezas en rompecabezas, castaño oscuras 6-21 x 6-21 μm .

Clave patrón: 2.6.11.37.39.44.51.54

Según clave desarrollada por Deschamps & Wright (1975).

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 35,68" S 58° 29' 3,72" O (**Sitio A-A1**), 16-VII-2010, a partir de madera sintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4387).

Observaciones: El estudio coincide con las descripciones de Nobles (1948) y Stalpers (1978) para *Pseudochaete tabacina* (Sowerby) T. Wagner & M. Fisch. El género *Hymenochaete* ha sido estudiado en la Argentina por diversos autores tales como Greslebin & Rachjenberg (2003) y Wright & Wright (2005). No se lo ha encontrado citado sobre *Platanus acerifolia*.

Inonotus rickii (Pat.) D.A. Reid. *Kew Bulletin* 12(1): 141 (1957) (Fig. 40)

Clase Incertae sedis

Orden Hymenochaetales

Familia Hymenochaetaceae

Descripción: ver Wright & Iaconis (1955).

Clave patrón: 2.6.8.18.34.37.39.46. (47).53.54

Según clave desarrollada por Deschamps & Wright (1975).

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 34' 47,85" S 58° 29' 13,97" O (**Sitio A-A3**), 10-VIII-2010, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4301); ídem (**Sitio A-A3**) 1-IX-2010 (BAFCcult 4302); ídem, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 10-VIII-2010 (BAFCcult 4303); ídem, 34° 36' 50,70" S 58° 23' 43,48" O (**Sitio B-B5**), 10-XI-2010, a partir de madera sintomática de *P. acerifolia* (BAFCcult 4304); ídem, 34° 34' 53,78" S 58° 29' 13,99" O (**Sitio A-A4**), 10-V-2010, a partir de madera sintomática de *P. acerifolia* (BAFCcult 4305).

Tipo de pudrición: blanca (Wright & Iaconis, 1955).

Observaciones: El estudio de cultivos describe la forma anamórfica de *Inonotus rickii*: *Ptychogaster cubensis* Pat. El estudio coincide con las descripciones de Wright & Iaconis (1955) excepto por la velocidad de crecimiento, donde los cultivos estudiados cubrían la caja al término de la segunda semana, y con la descripción de Robles *et al.* (2011), en la cual ya se habían descripto cepas que cubrían la caja al término de 6 semanas.

Notas: *Inonotus rickii* es un hongo de pudrición ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales. En zonas templadas, sin embargo, se encuentra asociado principalmente a ambientes urbanos. Además de haber sido encontrado afectando árboles urbanos de Sudamérica (Gottlieb *et al.*, 2002; Robles *et al.*, 2011), se lo ha reportado en varios países de Europa (Annesi *et al.*, 2003; Intini & Tello, 2003; Melo *et al.*, 2002) y en Norteamérica (Farr *et al.*, 1989). En Argentina ha sido previamente citado sobre *Platanus acerifolia* (Robles *et al.*, 2011), *Casuarina cunninghamiana*, *Acer sp.*, *Acer negundo*, *Celtis australis*, *Lippia citriodora* y *Acacia melanoxylon* (Gottlieb *et al.*, 2002), evidenciando su amplio rango de hospedantes. No se han encontrado registros de esta especie como endofito. Sin embargo, existen algunos trabajos en los cuales se han aislado cepas endofíticas de *Inonotus* colonizando madera, sobre *Podocarpus saligna* de Chile (Oses *et al.*, 2008) y tallos de *Theobroma cacao* de Costa Rica (Crozier *et al.*, 2006).

Phanerochaete chrysosporium Burds., *Mycotaxon* 1(2): 124 (1974) (Fig. 41)

Clase Incertae sedis

Orden Polyporales

Familia Phanerochaetaceae

Descripción:

Caracteres macroscópicos: Crecimiento rápido, cubriendo la caja al término de la primera semana. Colonia blanca, esponjosa en un principio luego adoptando un aspecto pulverulento debido a la gran esporulación. Margen regular. Reverso inalterado a lo largo del estudio. No se detectó olor característico.

Caracteres microscópicos: Hifas hialinas estériles con septos simples y de pared delgada, 2,5-7 (8) μm ancho, las hifas fértiles más delgadas, con septos simples, alrededor de 1 μm ancho. Presencia de algunas hifas con pared gruesa, 4-7 μm ancho, pared de 1,5-2,5 μm ancho. Conidios laterales y terminales con desarrollo simpodial, solitarios, unicelulares, hialinos, lisos o con pequeñas equinulaciones, muy abundantes hacia la tercer semana, al principio con pared delgada y luego desarrollando una pared más gruesa, obovoides a piriformes, 8-10 x (5) 6-7 μm . Hacia la cuarta-quinta semana el micelio aéreo se compone principalmente de conidios, con escasa presencia de hifas. Clamidosporas, escasas, se observan mayormente a partir de la sexta semana, 13-39 μm diámetro. Hacia la quinta semana se observan hifas con partes del citoplasma colapsado, como si fueran a formar artrosporas.

Clave patrón: 1. 6. (7). 33. 34. 35. 36. 40. 41. (51). 53. 54. 55. (57). 59

Según clave desarrollada por Deschamps & Wright (1975).

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 39' 21,62" S 58° 29' 15,51" O (**Sitio C-C5**), 11-XI-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4415).

Tipo de pudrición: pudrición blanca de tronco y ramas de angiospermas y gimnospermas (Burdsall & Elysn, 1974).

Observaciones: la descripción coincide con la realizada por Stalpers (1978) y Nakasone (1990).

Notas: Esta especie ha sido utilizada en trabajos de evaluación enzimática en la Argentina (Levin *et al.*, 2004), aunque no existen registros previos de cepas aisladas en el país. Ha sido reportada para Norteamérica y Europa (Burdsall & Elysn, 1974; Nakasone, 1990). El género *Phanerochaete* ha sido citado como endofito de tallo de *Theobroma cacao* (Crozier *et al.*, 2006), pero no se han encontrado registros hasta el momento de esta especie como endofito de madera. *Phanerochaete chrysosporium* ha sido citado para *Platanus wrightii* (Burdsall & Elysn, 1974). No se han encontrado registrado de esta especie sobre *Platanus acerifolia* u otros árboles urbanos.

Trichosporon sporotrichoides (Oorschot) Oorschot & de Hoog, *Antonie van Leeuwenhoek* 47(4): 364 (1981) (Fig. 42)

Clase Tremellomycetidae

Orden Tremellales

Familia Trichosporonaceae

Descripción: ver Van Oorschot (1980).

Crecimiento lento, colonia de color blanco o crema, micelio sumergido o muy apretado contra el agar, de consistencia húmeda. Hifas sumergidas, con frecuencia desarticulándose por los septos, fértiles, (1) 2-4 (6) μm ancho, (8) 11-23 (27) μm largo de los fragmentos resultantes por la desarticulación. Conidios abundantes, solitarios, 1-5 por célula conidiógena, subhialinos, lisos y con paredes delgadas, la mayoría globosos, algunos ligeramente piriformes, 3-5 (7) x (1,5) 2-3 (4) μm .

Material examinado: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 34° 32' 40,40" S 58° 26' 38,90" O (**Sitio D**), 10-V-2011, a partir de madera asintomática de *P. acerifolia*, Robles C. (BAFCcult 4328); ídem (**Sitio D**), 10-V-2011 (BAFCcult 4329); ídem (**Sitio D**), 10-V-2011 (BAFCcult 4331); ídem, 34° 39' 27,30" S 58° 29' 14,03" O (**Sitio C-C4**), 11-XI-2011 (BAFCcult 4404); ídem, 34° 39' 21,62" S 58° 29' 15,51" O (**Sitio C-C2**), 18-IX-2011 (BAFCcult 4405); ídem, 34° 39' 28,45" S 58° 29' 6,79" O (**Sitio C-C5**), 18-IX-2011 (BAFCcult 4407); ídem, 34° 39' 27,30" S 58° 29' 14,03" O (**Sitio C-C4**), 11-XI-2011 (BAFCcult 4408).

Notas: El género *Trichosporon* comprende a anamorfos de Tremellales que tienen una forma levaduriforme y producen conidios blásticos y átricos (Seifert *et al.*, 2011). Este género está ampliamente distribuido en la naturaleza y se los encuentra predominantemente en sustratos como suelo y madera en descomposición (Chagas-Neto *et al.*, 2008). El género ha sido citado para la Argentina (Pajot *et al.*, 2008). Existen pocos registros de este género como endofito, en tejidos de plantas almacenadas y raíces (Götz *et al.*, 2006; Isaeva *et al.*, 2010), aunque no se lo registró como endofito de madera. La especie *T. sporotrichoides* no ha sido reportada como endofito ni ha sido citada previamente para la Argentina. Es la primera cita para *Platanus acerifolia*.

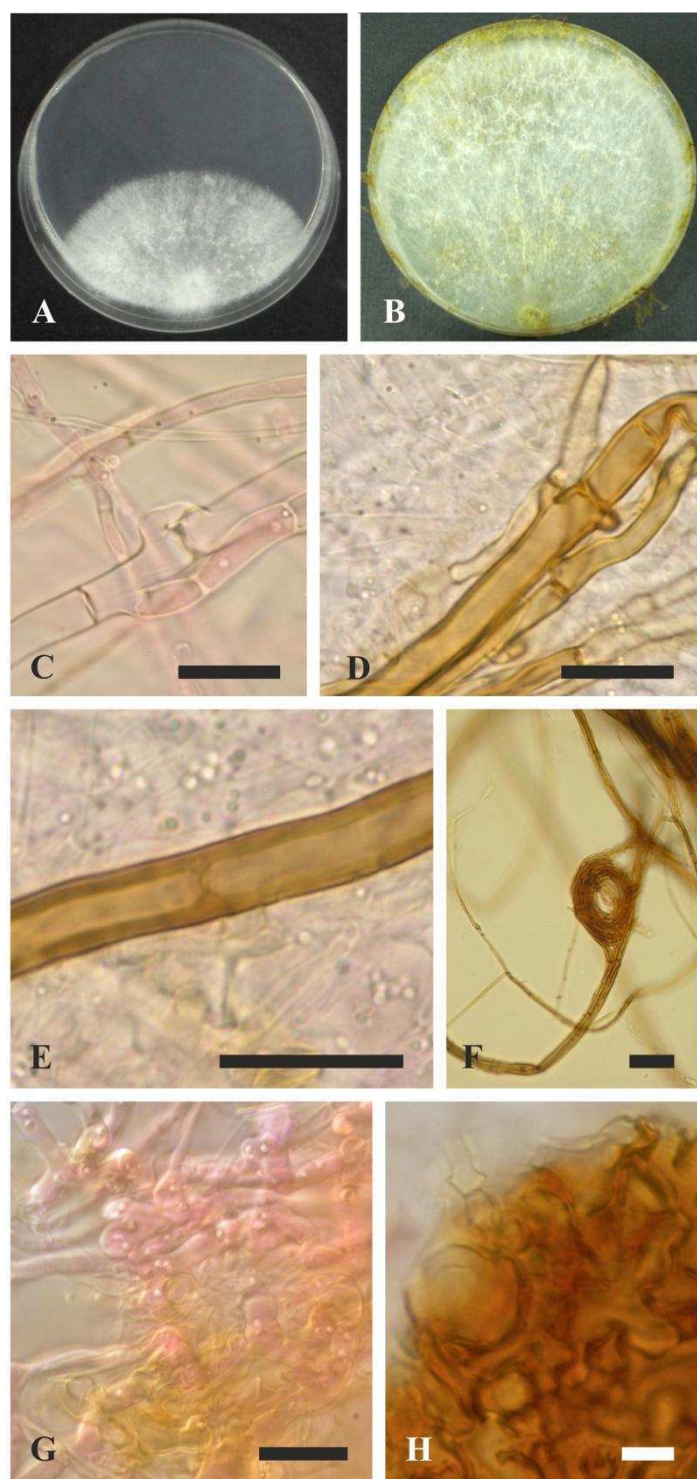


Figura 36: *Coprinellus micaceus*. (A) Colonia al término de la primera semana en medio Nobles, (B) colonia al término de la sexta semana en medio Nobles, (C) hifa fibulada y ramificada, (D-E) hifa melanizada con septos simples, escasamente ramificada, con paredes engrosadas, (F) cordones de hifas melanizadas, (G) hifas ensanchadas y parcialmente melanizadas para la posterior formación de un plecténquima, (H) plecténquima. Escala: 10 μ m en C, F-G; 50 μ m en D-E.

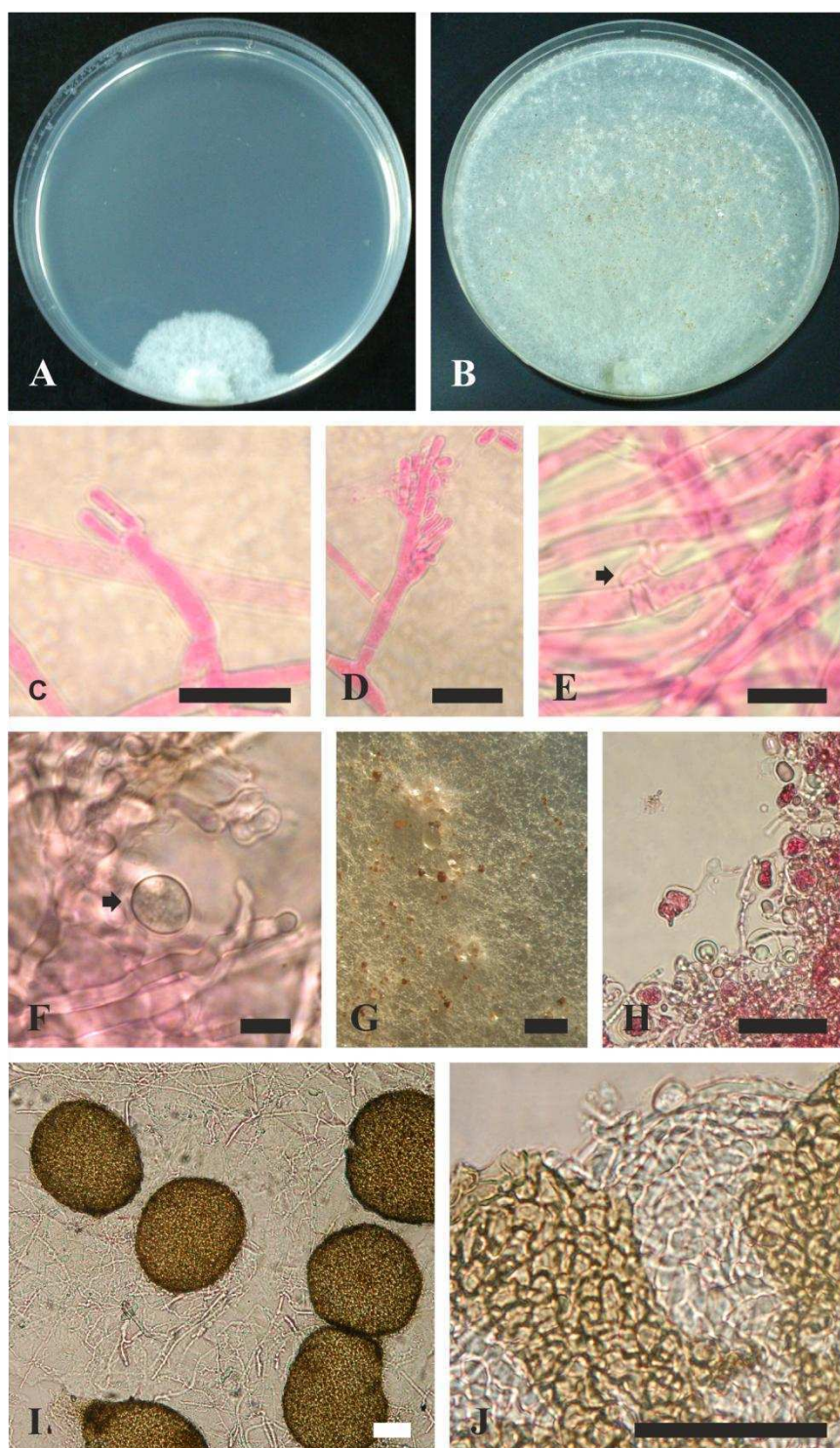


Figura 37: *Coprinopsis cinerea*. (A) Colonia al término de la primera semana en medio Nobles, (B) colonia al término de la sexta semana en medio Nobles, (C-D) formación de artrosporas, (E) presencia de fibulas (flecha), (F) presencia de clamidosporas (flecha), (G) presencia de hifas modificadas, precursoras de la formación de esclerocios, (H) vista a lupa de esclerocios, (I) esclerocios, (J) detalle de la pared del esclerocio y las hifas internas. Escala: 10 μ m en C-F; 1 mm en G; 50 μ m en H-J.

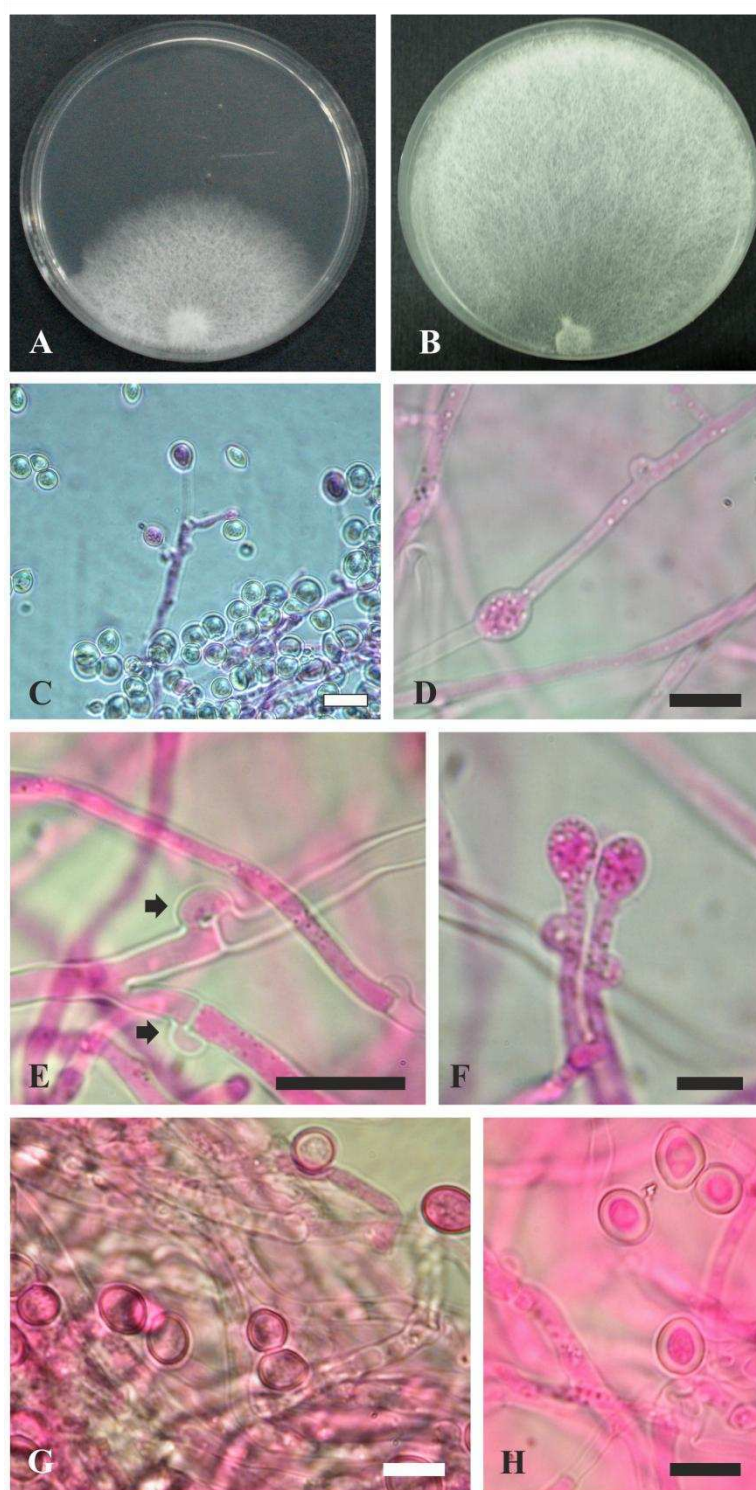


Figura 38: *Granulobasidium vellereum*. (A) Colonia al término de la primera semana en medio Nobles, (B) colonia al término de la sexta semana en medio Nobles, (C) vista general de hifas vegetativas y clamid esporas, (D) formación de clamid esporas intercalares, (E) presencia de fibulas, indicadas por flechas, (F) clamid esporas terminales en formación, (G-H) detalle de clamid esporas en micelio vegetativo, con pared celular gruesa. Escala: 10 μ m en C-H.

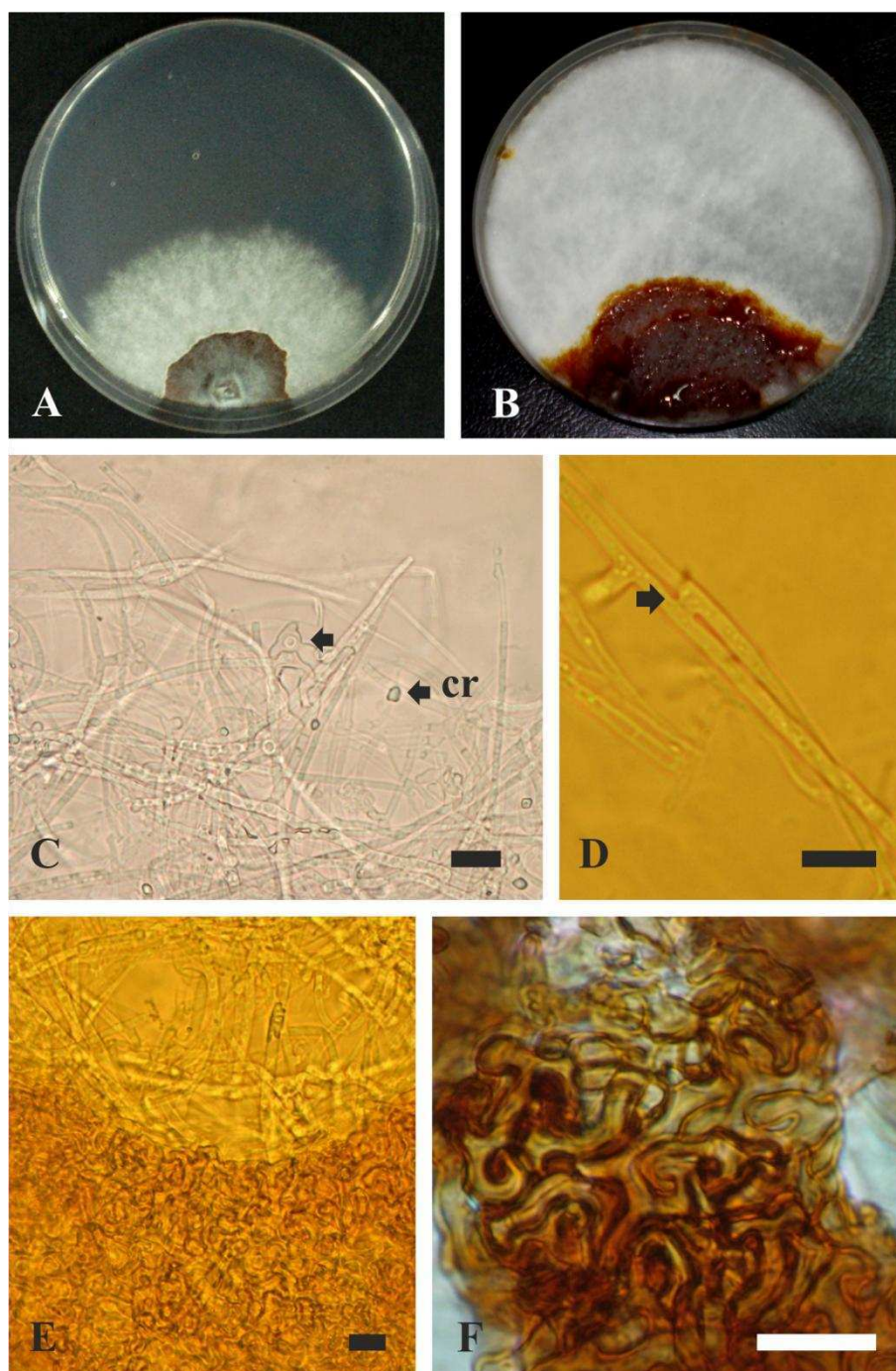


Figura 39: *Hymenochaete* sp. (A) Colonia al término de la primera semana en medio Nobles, (B) colonia al término de la sexta semana en medio Nobles, (C) micelio vegetativo, con hifas septadas afibuladas, presencia de cristales (flecha) e hifas modificadas, precursoras de plecténquima, (D) anastomosis (flecha) de hifas vegetativas, (E) plecténquima con hifas en forma de rompecabezas, adyacente a micelio vegetativo, (F) detalle de hifas en rompecabezas. cr: cristales. Escala: 10 μ m en C-F.

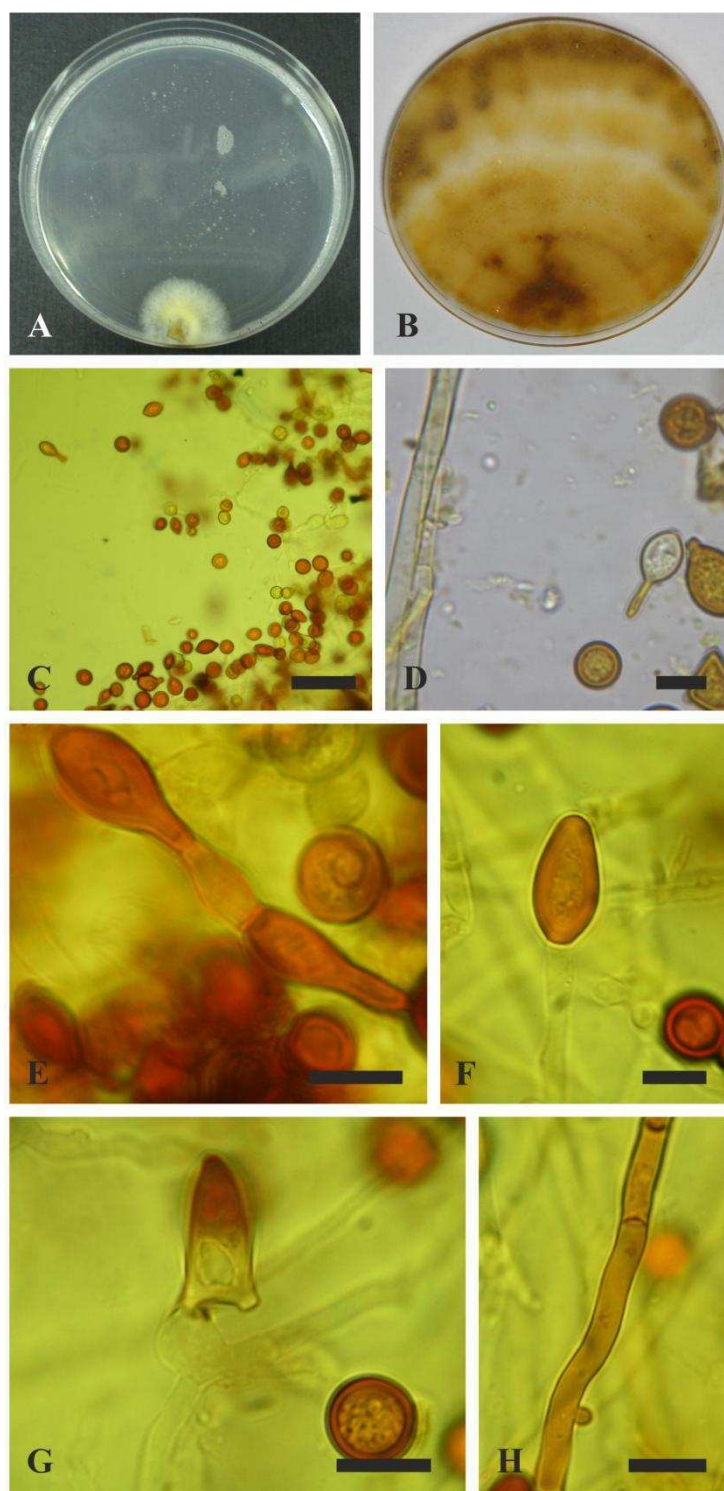


Figura 40: *Inonotus rickii*. (A) Colonia al término de la primera semana en medio Nobles, (B) colonia al término de la sexta semana en medio Nobles, (C) vista general de hifas vegetativas y clamidosporas, (D) detalle de clamidosporas sueltas e hifas con septos simples, (E) formación de clamidosporas en cadena, (F-G) clamidosporas en formación, (H) hifa vegetativa pigmentada. Escala: 50 μm en C; 10 μm en D-H.

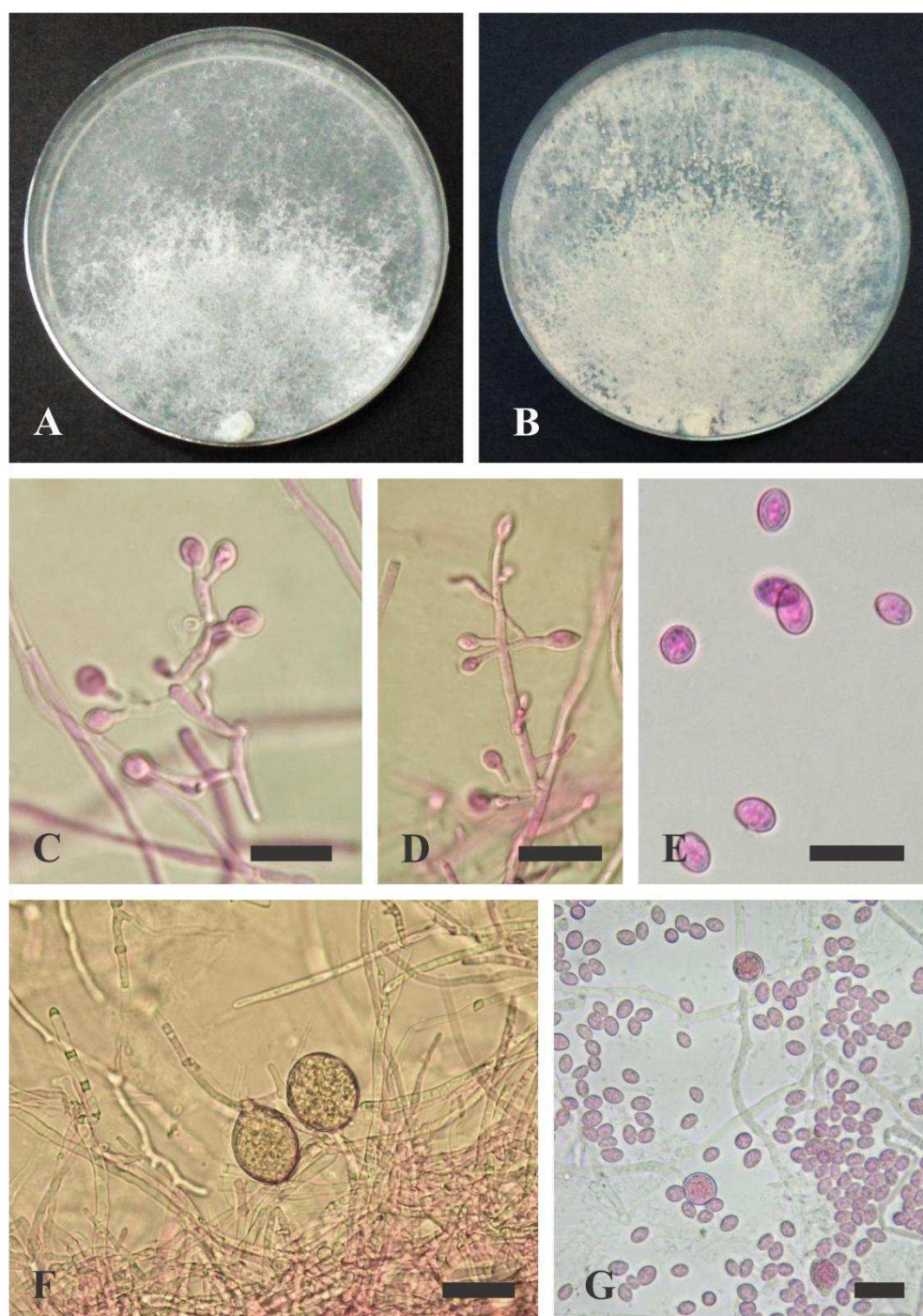


Figura 41: *Phanerochaete chrysosporium*. (A) Colonia al término de la primera semana en medio Nobles, (B) colonia al término de la sexta semana en medio Nobles, (C-D) formación de conidios, (E) conidios, (F) clamidosporas, (G) conidios y clamidosporas. Escala: 10 μm en C- D; 20 μm en E-G.

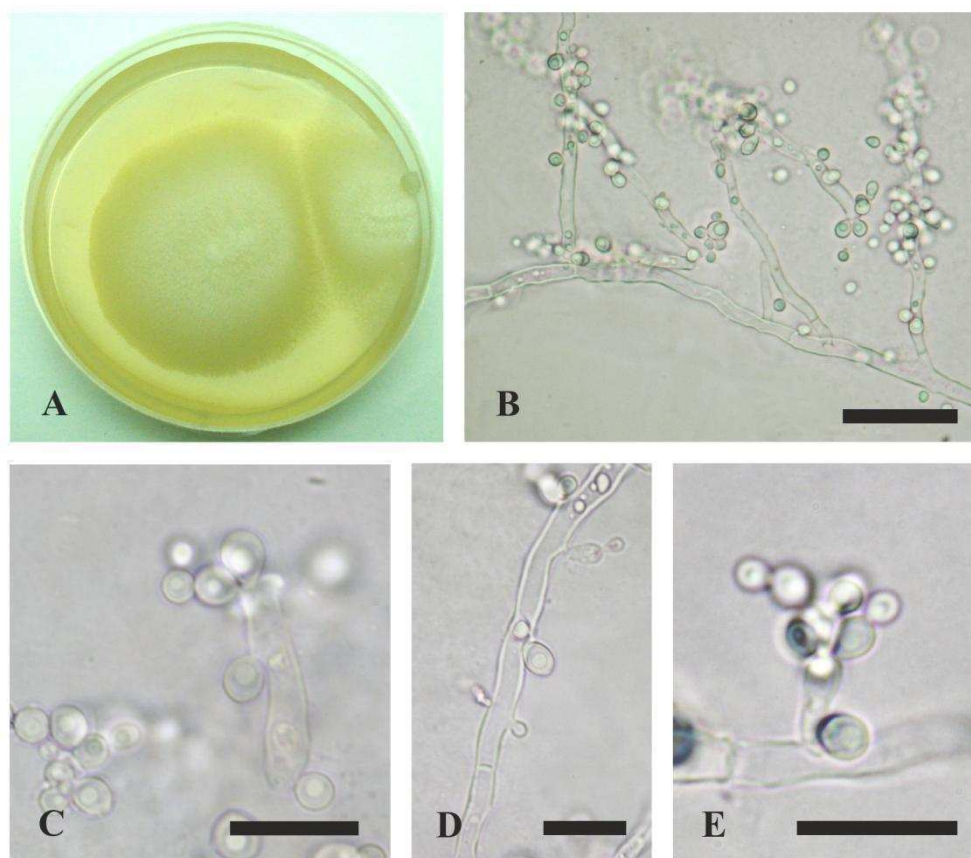


Figura 42: *Trichosporon sporotrichoides*. (A) Colonia en MEA 2%, (B) hifas con formación de conidios, (C) conidios y artrosporas, (D) detalle de formación de conidios, (E) detalle de formación de conidios en cadena. Escala: 20 μm en B; 10 μm en C- E.

3. Resultados moleculares y filogenéticos

Durante el desarrollo de este trabajo un total de 42 aislamientos fueron secuenciados, obteniéndose 25 secuencias de ADN correspondientes a la región ITS1/ITS2 y 17 secuencias de ADN correspondientes al gen de la β -tubulina. A continuación se muestran los resultados de los análisis realizados.

3.1. Análisis de similitud por BLAST

Los secuencias de cepas endofíticas y patogénicas BAFCcult 4384, 4309, 4310, 4413, 4416 y 4451 para la región ITS fueron idénticas en un 94% a *Daldinia concentrica* (AF176954-AF176958), con 100% *Query coverage*. Estos aislamientos mostraron una similitud del 93-94% y 96-100% de *Query coverage* con diferentes especies de *Daldinia*. Al analizar las regiones β -tubulina se observó que éstas fueron idénticas en un 94% a *Hypoxyton placentifforme* – nombre actual *Daldinia placentifformis* (Berk. & M.A. Curtis) Theiss - (AY951746), con 54-95% de *Query coverage* y asimismo mostraron una similitud del 92-90% y 54-93% de *Query coverage* con diferentes especies de *Daldinia*.

La secuencia del endofito BAFCcult 4361 fue 99% idéntica a secuencias de *Coprinopsis cinerea* (AB097562; AB097563; GQ131575; JQ796875) (100% *Query coverage*).

Las secuencias de los basidiomicetes endofíticos BAFCcult 4362, 4363, 4365-4367 fueron iguales en un 98% a secuencias de *Hypochnicium vellereum* (sinónimo *Granulobasidium vellereum*) (AY787674) con 87% de *Query coverage* y 99% idénticos a *G. vellereum* (DQ677490), sin embargo con sólo 58% *Query coverage*.

La búsqueda utilizando BLAST dió como resultado, en el caso del basidiomicete BAFCcult 4387 un 97% de identidad con *Hymenochaete spreta* (AY558597), con 97% de *Query coverage*. La secuencia de este aislamiento mostró identidades de 90-95% con 90-99% de *Query coverage* con secuencias de diferentes especies de *Hymenochaete*.

Las secuencias ITS de los basidiomicetes endofíticos y patogénicos BAFCcult 3300, 3304, 3305, 3307, 3308, 3316, 4301-4305) mostraron similitudes de 99% con *Inonotus rickii* (FJ860053 y FJ667753) con alrededor de 98% de *Query coverage*. Las secuencias β -tubulina de estos aislamientos no produjeron ningún resultado en el BLAST.

Finalmente, el endofito BAFCCult 4415 mostró una similitud del 99% con el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* (GU966518) (100% *Query coverage*).

A partir de estos resultados se seleccionaron las secuencias más idóneas para incluir en las matrices correspondientes utilizadas en los análisis filogenéticos presentados a continuación.

3.2. Resultados filogenéticos

El análisis mediante el programa MEGA versión 5.1 tuvo la finalidad de averiguar el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a cada matriz de secuencias, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 13). Los modelos resultantes fueron utilizados en los análisis de inferencia bayesiana con el programa MrBayes.

Matriz	Modelo evolutivo	Descripción
Especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> , región ITS	Kimura-2-parámetros, distribución gamma	Este modelo distingue entre transiciones (purina a purina o pirimidina a pirimidina) y transversiones (purina a pirimidina y viceversa) y asume que la frecuencia de los diferentes nucleótidos es igual.
Especies de <i>Daldinia</i> e <i>Hypoxylon</i> , región del gen de la β -tubulina	Kimura-2-parámetros, distribución gamma inversa	--
Especies de <i>Coprinellus</i> y <i>Coprinopsis</i> , región ITS	Jukes y Cantor, distribución gamma	En este modelo la tasa de sustitución nucleotídica se considera igual para todos los pares de los cuatro nucleótidos.
Especies de <i>Campanophyllum</i> , <i>Cheimonophyllum</i> , <i>Chondrostereum</i> , <i>Cyphella</i> , <i>Granulobasidium</i> e <i>Hypochnicium</i> región ITS	Kimura-2-parámetros, distribución gamma	---
Especies de <i>Hymenochaete</i> y <i>Pseudochaete</i> , región ITS	Tamura-3-parámetros, distribución gamma	Este modelo toma en consideración las diferencias en las tasas de transición y transversión, junto con el mayor contenido de G+C.
Especies de <i>Inocutis</i> e <i>Inonotus</i> , región ITS	Kimura-2-parámetros, distribución gamma	--
Cepas de <i>Inonotus</i> , región gen de la β -tubulina	Kimura-2-parámetros, distribución gamma	--
Especies de <i>Phanerochaete</i> , región ITS	Kimura-2-parámetros, distribución gamma	--

Tabla 13: Modelo evolutivo de mejor ajuste para cada matriz evaluada, a partir del análisis con el programa Mega 5.1.

Análisis filogenético de las cepas asignadas al género *Nodulisporium*

Región ITS

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estáticas* incluyó 36 secuencias de referencia (Tabla 2) más las correspondientes a los aislamientos (BAFCcult 4384, 4409, 4410, 4413, 4416, 4451). El análisis dió como resultado 4 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 827; Ci= 48; Ri= 66). Se obtuvieron 220 caracteres informativos (19 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que las secuencias pertenecientes a las cepas aisladas en este trabajo se ubicaron en dos clados, uno compuesto por BAFCcult 4410, 4413 y 4451; y el otro por BAFCcult 4384, 4409 y 4416, ambos con alto soporte de Bootstrap (100 %). Las 6 secuencias se agrupan con secuencias de *Daldinia clavata*, *Daldinia caldiorum* y *Daldinia eschscholzii* (Bootstrap 100 %). Las cepas BAFCcult 4409, 4410 y 4416 son cepas endofíticas mientras que las cepas BAFCcult 4384, 4413 y 4451 corresponden a cepas patogénicas. Todas las secuencias de *Daldinia* spp., junto con las secuencias de este trabajo se agruparon en un clado diferente al correspondiente a las especies de *Hypoxylon* (perteneciente, al igual que *Daldinia*, a la familia Xylariaceae) (Bootstrap 100 %).

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 500000-800000 generaciones, descartando luego el 25 % de los árboles. Las secuencias de este trabajo no se asociaron directamente a ninguna especie de *Daldinia* o *Hypoxylon*, aunque se agruparon en un clado con secuencias de *Daldinia caldiorum*, *Daldinia clavata* y *Daldinia eschscholzii* (0,53 probabilidad *a posteriori*). Las secuencias BAFCcult 4384, 4409 y BAFCcult 4416 se ubicaron en clado hermano (0,86 de probabilidad) y las secuencias BAFCcult 4410, 4413 y 4451 conformaron un clado aparte (0,97 probabilidad) (Fig. 43).

Se realizaron análisis bajo *homologías dinámicas* bajo diferentes hipótesis de homología (diferentes costos asignados a sustituciones, inserciones, deleciones y apertura de gaps, ver sección de Materiales y Métodos). Bajo el costo a) el árbol más parsimonioso tuvo un costo total de 5919. Las secuencias de BAFCcult 4384, 4410 y 4413 se ubicaron en un mismo clado con *Hypoxylon macrocarpum* (soporte de Bremer 505), aunque separado del resto de las secuencias de *Hypoxylon* incluidas en el análisis. Las secuencias de BAFCcult 4409, 4416 y 4451 se agruparon en un mismo clado con un

soporte de Bremer de 751 (Fig. 44). Al aplicar el costo b), se obtuvo un árbol de mayor parsimonia con costo igual a 6372. En este caso, las secuencias BAFCcult 4416 y 4413 se ubicaron en un mismo clado (soporte de Bremer 198) y las secuencias BAFCcult 4409, 4410 y 4451 en un clado diferente (soporte de Bremer 3934). Las secuencias de este trabajo se agruparon a su vez en el mismo clado con secuencias de *D. clavata*, *D. eschscholzii*, *D. caldiorum* y dos secuencias de *Hypoxylon*: *Hypoxylum fuscum* e *Hypoxylum macrocarpum* (soporte de Bremer 2924). La secuencia BAFCcult 4384 se ubicó separada de las restantes secuencias incluidas en el análisis.

Al incluir en el análisis muestras ambientales (*environmental samples*), por medio del BLAST, no se obtuvieron resultados significativos.

Se evaluó la similitud entre secuencias (sin alinear), con el fin de explorar la relación entre las secuencias endofíticas y patogénicas de *Nodulisporium*, en base a las diferencias surgidas entre los distintos análisis filogenéticos. Se observó la mayor similitud entre las secuencias de una cepa endofítica y la de una cepa patogénica (BAFCcult 4409 y 4451) las cuales a su vez fueron obtenidas a partir de muestras de árboles cercanos entre sí (Tabla 14).

	BAFCcult 4384 P	BAFCcult 4409 E	BAFCcult 4410 E	BAFCcult 4413 P	BAFCcult 4416 E	BAFCcult 4451 P
BAFCcult 4384 P	1	--	--	--	--	--
BAFCcult 4409 E	0,16	1	--	--	--	--
BAFCcult 4410 E	0,17	0,24	1	--	--	--
BAFCcult 4413 P	0,14	0,23	0,21	1	--	--
BAFCcult 4416 E	0,13	0,19	0,23	0,24	1	--
BAFCcult 4451 P	0,18	0,88	0,24	0,20	0,17	1

Tabla 14: Similitud de secuencias para la región ITS1/ITS2 de cepas endofíticas y patogénicas de *Nodulisporium* aisladas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.

Región β -tubulina

El análisis de *máxima parsimonia homologías estáticas* incluyó 26 secuencias de referencia (Tabla 3) más las correspondientes a los aislamientos (BAFCcult 4384, 4409, 4410, 4413, 4416, 4451). El análisis dió como resultado 2 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 827; Ci= 48; Ri= 59). Se obtuvieron 672 caracteres informativos (38 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que las secuencias

pertenecientes a las cepas BAFCcult 4409, 4413, 4416 y 4451 se ubicaron en un mismo clado con un soporte de Bootstrap de 98 %. Las secuencias de las cepas BAFCcult 4384 y 4410 se ubicaron por fuera de este clado, pero formando un mismo clado con dos secuencias de *Hypoxylon placentiforme* (nombre actual: *Daldinia placentiformis*), con un alto soporte de Bootstrap (84 %). No se observó una separación entre las cepas endofíticas (BAFCcult 4409, 4410 y 4416) y las cepas patogénicas (BAFCcult 4384, 4413 y 4451). Los análisis mostraron en cambio, una separación entre las secuencias de *Daldinia* spp., de las especies de *Hypoxylon*, a excepción de *H. placentiforme* e *Hypoxylon brevisporum*, aunque con bajo valor de Bootstrap (57 %).

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 100000 generaciones, descartando luego el 25 % de los árboles. Las secuencias de este trabajo se ubicaron en un mismo clado junto con las dos secuencias de *Hypoxylon placentiforme* (0,86 probabilidad *a posteriori*), de manera similar a lo ocurrido al evaluar máxima parsimonia bajo homologías estáticas. Las secuencias BAFCcult 4409, 4413, 4416 y 4451 se ubicaron en el clado hermano (1 de probabilidad) (Fig. 45).

Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) se obtuvieron 6 árboles más parsimoniosos con costo de 6773. Las secuencias de este estudio no mostraron asociación con ninguna de las restantes secuencias analizadas. Sí se observó que las secuencias de las cepas BAFCcult 4409, 4413 y 4451 (correspondientes a dos patógenos y un endofito) se ubicaron en un mismo clado (soporte de Bremer 6215) (Fig. 46). Al aplicar el costo b), se obtuvieron 4 árboles de mayor parsimonia con costo igual a 8538. La topología del árbol fue similar al caso anterior con el costo a). En este caso, sin embargo, aunque las secuencias de este trabajo no mostraron asociación con el resto de las secuencias evaluadas, sí conformaron un clado distintivo (soporte de Bremer 157).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, no se obtuvieron resultados significativos.

Se evaluó la similitud entre secuencias (sin alinear), con el fin de analizar mejor la relación entre las secuencias endofíticas y patogénicas de *Nodulisporium*, en base a las diferencias surgidas entre los distintos análisis filogenéticos. Se observó la mayor similitud entre las secuencias de dos cepas patogénicas (BAFCcult 4413 y 4451) (Tabla 15).

	BAFCcult 4384 P	BAFCcult 4409 E	BAFCcult 4410 E	BAFCcult 4413 P	BAFCcult 4416 E	BAFCcult 4451 P
BAFCcult 4384 P	1	--	--	--	--	--
BAFCcult 4409 E	0,21	1	--	--	--	--
BAFCcult 4410 E	0,21	0,22	1	--	--	--
BAFCcult 4413 P	0,23	0,30	0,21	1	--	--
BAFCcult 4416 E	0,27	0,21	0,24	0,24	1	--
BAFCcult 4451 P	0,17	0,25	0,21	0,36	0,17	1

Tabla 15: Similitud de secuencias para la región del gen de la β -tubulina de cepas endofíticas y patogénicas de *Nodulisporium* aisladas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.

Análisis filogenético de las cepas asignadas a la especie *Coprinopsis cinerea*

Región ITS

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estática* incluyó 34 secuencias de referencia (Tabla 4) más la correspondiente al aislamiento (BAFCcult 4361). El análisis dió como resultado 245 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 551; Ci= 62; Ri= 86). Se obtuvieron 228 caracteres informativos (27 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que las secuencias de la cepa obtenida en este trabajo se ubicó en un mismo clado junto con la gran mayoría de las secuencias de *Coprinopsis cinerea*, con un soporte de 100 %. Sólo dos secuencias de *C. cinerea* (JN943122 y JN94328) se ubicaron en un clado separado, cercanas a *Coprinopsis radiata*. Las secuencias de *Coprinopsis* conformaron un clado claramente separado de las de *Coprinellus* (Bootstrap 100 %), incluyendo las 4 secuencias de *Coprinellus micaceus* argentinas (Robles *et al.*, 2011).

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 500000 generaciones, descartando luego el 25 % de los árboles. La secuencia de este trabajo se agrupó con otras secuencias de *C. cinerea* con una probabilidad de 1 (Fig. 47).

Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) el árbol de mayor parsimonia obtenido tuvo un costo de 4475. La secuencia obtenida durante este trabajo se ubicó junto con secuencias de *C. cinerea* en un mismo clado (soporte de Bremer 2085). Salvo por una secuencia de *Coprinopsis stercorea* (FM878028), el resto de las secuencias de *Coprinopsis* se agruparon en un clado diferente (soporte de Bremer

1135). Las secuencias de *Coprinellus* aparecieron en un clado diferente (soporte muy elevado) (Fig. 48). Al aplicar el costo b), el árbol más parsimonioso tuvo un costo de 5200. La secuencia de este trabajo se agrupó con otras 3 secuencias de *C. cinerea* (EU168109, FJ713066 y FJ713078) con un alto soporte de Bremer (2595).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, se obtuvieron varias secuencias con un alto grado de similitud con la secuencia de este trabajo:

- Con una Identidad de 100 % y 100 % de *Query coverage*, una muestra ambiental obtenida de suelo (GQ219811), en Alemania (Christ *et al.*, 2011) y otra obtenida de muestras de aire (GQ851873), en Europa Central (Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2009).

- Con una Identidad de 99 % y *Query coverage*= 98-97 %, 4 muestras obtenidas de compost de residuos urbanos, de Noruega y Finlanda (FM177671-FM173072-AM711462 y AM711366) (Hultman *et al.*, 2008a; 2008b; 2010).

- Con una Identidad de 98-97 % y *Query coverage*= 100 %, muestras obtenidas a partir de raíz de *Bouteloua gracilis*, en Nuevo México, EE.UU. (Porrás-Alfaro *et al.*, 2008) (EU144562 - EU144563 - EU144568 - EU144569 - EU144571 - EU144572 - EU144573 - EU144576 - EU144579 - EU144580 - EU144588 - EU144589 - EU144595- EU144596 - EU144598 y EU144601).

Análisis filogenético de las cepas asignadas a la especie *Granulobasidium vellereum*

Región ITS

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estáticas* incluyó 24 secuencias de referencia (Tabla 5) más las correspondientes a los aislamientos (BAFCcult 4362, 4363, 4365-4367). El análisis dio como resultado 9 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 1421; Ci= 58; Ri= 79). Se obtuvieron 437 caracteres informativos (20 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que las 4 secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas en este trabajo se ubicaron en un mismo clado, junto con dos secuencias de *Hypochnicium vellereum* (AY787674 y HE586734) con un muy alto soporte (99 %). A su vez, este clado se asoció a las restantes secuencias pertenecientes a especies de la familia Cyphellaceae (Bootstrap 96 %). Las secuencias de distintas especies de *Hypochnicium* se ubicaron en un clado separado (Bootstrap 98 %). Una secuencia de *G.*

vellereum (DQ205683) se ubicó en el mismo clado que los restantes *Hypochnicium*, aunque esta asociación no se mantuvo al realizar el soporte de Bootstrap, quedando por fuera de los clados principales.

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 500000 generaciones, descartando luego el 25 % de los árboles. Las secuencias de este trabajo se ubicaron en un clado hermano con una secuencia de *H. vellereum* (AY787674) con una probabilidad de 0,99 y estas a su vez se ubicaron cercanas a otra secuencia de *H. vellereum* (HE586734), con una probabilidad de 1. La restante secuencia de esta especie se ubicó separada. Las secuencias de *Hypochnicium* se ubicaron en un clado diferente a las de la familia Cyphellaceae (Fig. 49).

Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) el árbol más parsimonioso tuvo un costo de 7833. Las secuencias de este trabajo BAFCCult 4362 y 4367 se agruparon en un mismo clado con una secuencia de *H. vellereum* (AY787674) (soporte de Bremer: 289). Las secuencias de especies de *Hypochnicium* se agruparon en un clado diferente a las restantes secuencias, todas pertenecientes a la familia Cyphellaceae, con un soporte muy alto (Fig. 50). Al aplicar el costo b), el árbol de mayor parsimonia fue de costo 9069. Las secuencias de este trabajo se agruparon con 2 secuencias de *H. vellereum* con un alto soporte de Bremer (6621), las mismas con las que se agruparon bajo homologías dinámicas. En esta ocasión no hubo una separación tan clara entre secuencias de *Hypochnicium* y secuencias de la familia Cyphellaceae como bajo el costo a).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, no se obtuvieron resultados significativos.

Análisis filogenético de las cepas asignadas al género *Hymenochaete*

Región ITS

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estáticas* incluyó 39 secuencias de referencia (Tabla 6) más la correspondiente al aislamiento (BAFCCult 4387). El análisis dió como resultado 9 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 1453; Ci= 45; Ri= 73). Se obtuvieron 375 caracteres informativos (37 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de

mayoría se observó que la secuencia de la cepa obtenida en este trabajo se ubicó en un mismo clado con otras secuencias del género *Hymenochaete* (Bootstrap 100%), si bien no se asoció con una especie en particular.

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 1500000 y 2000000 generaciones, descartando luego el 25 % de los árboles. Con 1500000 generaciones se llegó a una desviación estándar menor a 0,01. La secuencia de la cepa obtenida en este trabajo se ubicó en un mismo clado con otras secuencias del género *Hymenochaete* (probabilidad bayesiana *a posteriori*: 1), si bien no se asoció con una especie en particular (Fig. 51).

Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) el árbol más parsimonioso obtenido tuvo un costo de 5319. La secuencia de este trabajo se agrupó como grupo hermano con la secuencia de *Hymenochaete spreta* con un alto soporte (Bremer 194) (Fig. 52). Al aplicar el costo b), el árbol de mayor parsimonia tuvo un costo total de 6267. La secuencia de este trabajo se agrupó en un mismo clado con *Hymenochaete spreta*, *Hymenochaete rigidula* e *Hymenochaete lenta* (soporte de Bremer 218).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, se obtuvo una secuencia: GenBank Accession GU721341, con la que mostro una compatibilidad de identidad de 97% y 100 % de *Query coverage*. Sin embargo, no se trató de una muestra ambiental endofítica, o presente en madera, sino que fue obtenida a partir de polvo de interiores (Noris *et al.*, 2011).

Análisis filogenético de las cepas asignadas a la especie *Inonotus rickii*

Región ITS

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estáticas* incluyó 45 secuencias de referencia (Tabla 7) más las correspondientes a los aislamientos (BAFCcult 3300, 3304, 3305, 3307, 3308, 3316, 4301-4305). El análisis dió como resultado 1385 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 1517; Ci= 56; Ri= 77). Se obtuvieron 469 caracteres informativos (42% del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que todas las secuencias de este trabajo se ubicaron en un mismo clado con secuencias de *Inonotus*

rickii de distintos orígenes (Bootstrap 80 %). Las excepciones fueron las secuencias AY072026 (*Inonotus quercustris*) y AY072024 (*Inonotus patouillardii*), ambas de cepas de Argentina que se ubicaron dentro de este mismo clado. Las secuencias de las 3 cepas endofíticas (BAFCcult 4301-4303) se ubicaron juntas, junto con la secuencia de una de las cepas patogénicas (BAFCcult 3300).

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 1000000 generaciones, descartando luego el 25 % de los árboles. Al igual que con el análisis de máxima parsimonia anterior, todas las secuencias de este trabajo se ubicaron en un mismo clado con secuencias de *Inonotus rickii*, aunque con una probabilidad baja (0,59). Se recuperó el clado entre las secuencias de las 3 cepas endofíticas (BAFCcult 4301-4303) y la secuencia de BAFCcult 3300 con una probabilidad de 0,94 (Fig. 53).

Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) el árbol más parsimonioso tuvo un costo de 8819 y al aplicar el costo b), el árbol de mayor parsimonia fue de costo 10758. Para ambos costos, no se observó un único clado que agrupara a todas las secuencias de este trabajo, aunque todas se ellas se ubicaron en los mismos clados que otras secuencias de *Inonotus rickii* (valores de Bremer positivos). No se observó una asociación entre las secuencias de cepas endofíticas entre sí (Fig. 54).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, no se obtuvieron resultados significativos.

Al evaluar la similitud entre las secuencias de *I. rickii* endofíticas y patogénicas sin alinear, no se observaron diferencias conspicuas en la similitud de las secuencias (Tabla 16).

BAFCcult	3300 P	3304 P	3305 P	3307 P	3308 P	3316 P	4301 E	4302 E	4303 E	4304 P	4305 P
3300 P	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3304 P	0,29	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3305 P	0,19	0,18	1	--	--	--	--	--	--	--	--
3307 P	0,25	0,25	0,18	1	--	--	--	--	--	--	--
3308 P	0,25	0,20	0,22	0,22	1	--	--	--	--	--	--
3316 P	0,23	0,22	0,20	0,23	0,27	1	--	--	--	--	--
4301 E	0,25	0,25	0,19	0,25	0,24	0,25	1	--	--	--	--
4302 E	0,22	0,22	0,17	0,22	0,23	0,22	0,24	1	--	--	--
4303 E	0,22	0,22	0,22	0,22	0,24	0,26	0,24	0,27	1	--	--
4304 P	0,24	0,22	0,17	0,25	0,21	0,24	0,23	0,22	0,23	1	--
4305 P	0,27	0,25	0,18	0,24	0,26	0,24	0,23	0,21	0,27	0,23	1

Tabla 16: Similitud de secuencias para la región ITS1/ITS2 de cepas endofíticas y patogénicas de *I. rickii* aisladas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.

Región β -tubulina

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estáticas* incluyó las 11 secuencias correspondientes a los aislamientos (BAFCcult 3300, 3304, 3305, 3307, 3308, 3316, 4301-4305). El análisis dió como resultado 2 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 325; Ci= 65; Ri= 55). Se obtuvieron 140 caracteres informativos (23 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que las secuencias de las cepas BAFCcult 3307 y 4304, ambas patogénicas, se ubicaron un clado separado del resto de las cepas, con un alto valor de Bootstrap (100%). El resto de las secuencias se agruparon en un mismo clado (Bootstrap 100 %) pero no mostraron una separación clara entre aquellas endofíticas y las patogénicas.

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 1000000-1200000 generaciones, descartando luego el 25 % de los arboles. Al igual que con el análisis de máxima parsimonia bajo homologías estáticas, las secuencias de las cepas BAFCcult 3307 y 4304 se ubicaron en un mismo clado con muy alta probabilidad (1). Se reconocen dos clados más, uno conformado por las cepas BAFCcult 3304 y 4305, ambas patogénicas, con una probabilidad alta (0,98), y otro por las secuencias de BAFCcult 3305, 3308, 3316, todas patogénicas y la secuencia de BAFCcult 4303, una cepa endofítica (probabilidad 0,55). El clado conformado solamente por BAFCcult 3305, 3308 y 4303, presentó una probabilidad a posteriori más alta (0,77) (Fig. 55).

Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) se obtuvieron 5 árboles más parsimoniosos con costo 1275 y al aplicar el costo b), se obtuvieron 5 árboles más parsimoniosos con costo 1556. Para ambos costos, se observó que BAFCcult 3307 y 4304 se ubicaron en un mismo clado al igual que en el caso de los análisis anteriores, con altos valores de soporte. El resto de las secuencias no formaron clados distintivos que se mantuvieran para ambos costos, y no se observó asimismo una asociación entre las secuencias de cepas endofíticas o entre las secuencias de cepas patogénicas (Fig. 56).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, no se obtuvieron resultados significativos.

Al evaluar la similitud entre las secuencias de *I. rickii* endofíticas y patogénicas sin alinear, se observó una alta similitud de secuencias entre cepas endofíticas y patogénicas (BAFCcult 3300 y 4303; BAFCcult 33004 y 4303; y BAFC 3316 y 4302) (Tabla 17).

BAFCcult	3300 P	3304 P	3305 P	3307 P	3308 P	3316 P	4301 E	4302 E	4303 E	4304 P	4305 P
3300 P	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3304 P	0,82	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3305 P	0,20	0,22	1	--	--	--	--	--	--	--	--
3307 P	0,28	0,26	0,23	1	--	--	--	--	--	--	--
3308 P	0,24	0,23	0,20	0,20	1	--	--	--	--	--	--
3316 P	0,30	0,30	0,30	0,25	0,17	1	--	--	--	--	--
4301 E	0,19	0,22	0,26	0,27	0,18	0,27	1	--	--	--	--
4302 E	0,31	0,29	0,31	0,25	0,16	0,85	0,28	1	--	--	--
4303 E	0,81	0,75	0,24	0,26	0,22	0,39	0,25	0,41	1	--	--
4304 P	0,28	0,24	0,23	0,22	0,18	0,36	0,23	0,39	0,30	1	--
4305 P	0,24	0,25	0,43	0,25	0,59	0,24	0,25	0,26	0,28	0,22	1

Tabla 17: Similitud de secuencias para la región del gen de la β -tubulina de cepas endofíticas y patogénicas de *I. rickii* aisladas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.

Análisis filogenético de las cepas asignadas a la especie *Phanerochaete chrysosporium*

Región ITS

El análisis de *máxima parsimonia por homologías estáticas* incluyó 41 secuencias de referencia (Tabla 8) más la correspondiente al aislamiento (BAFCcult 4415). El análisis dió como resultado 12 árboles filogenéticos de máxima parsimonia (L= 722; Ci= 56; Ri= 69). Se obtuvieron 238 caracteres informativos (22 % del total de caracteres iniciales) en las secuencias incluidas en el análisis. A partir del árbol consenso de mayoría se observó que la secuencia de este trabajo se agrupó con las restantes secuencias de *Phanerochaete chrysosporium* con un soporte de Bootstrap 82 %.

Al realizar el *análisis bayesiano*, se realizaron 3 corridas con 2500000 generaciones, descartando luego el 25 % de los arboles. La secuencia de la cepa aislada en este trabajo se asoció a secuencias de *P. chrysosporium*, con una probabilidad de 0,97 (Fig. 57).

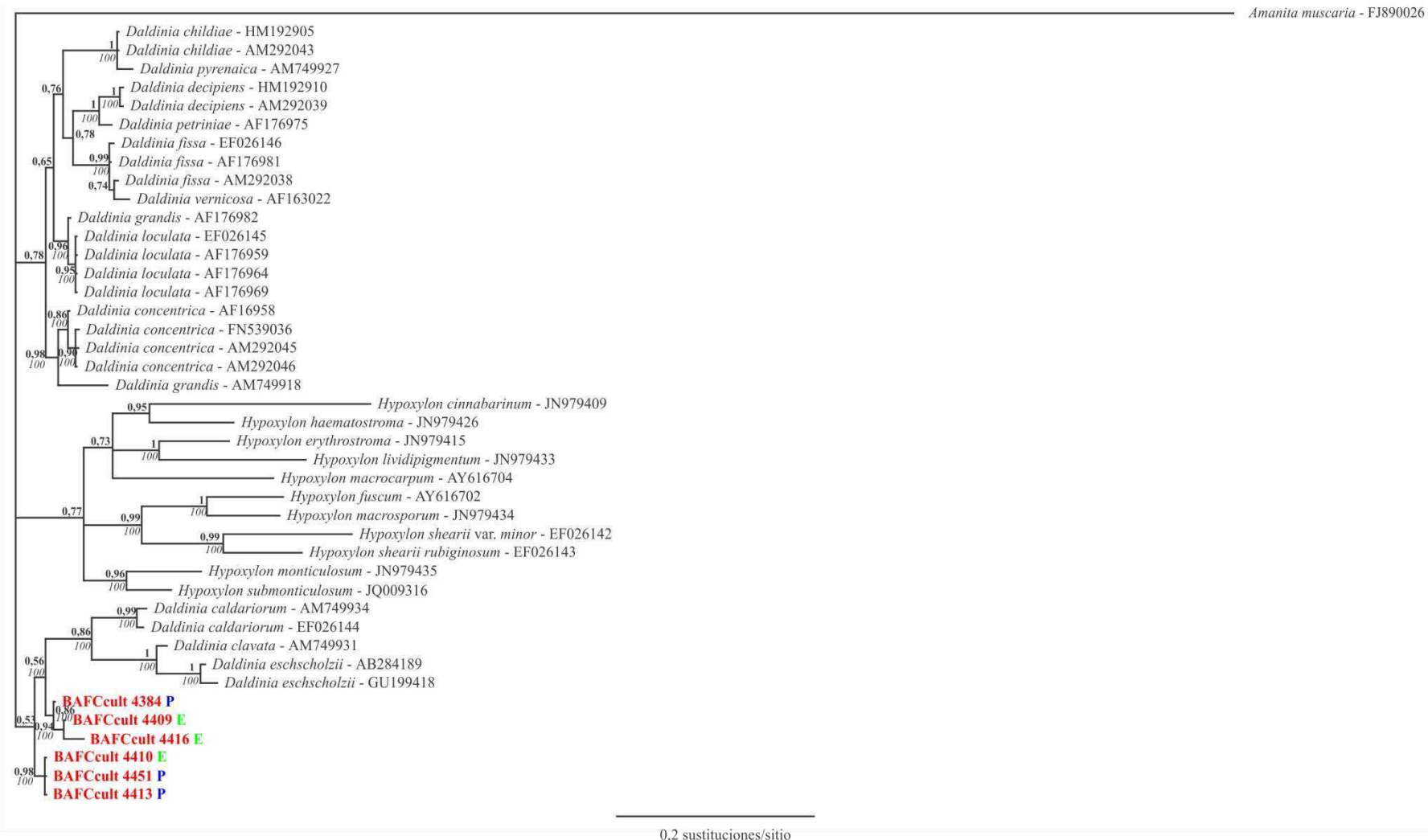
Al realizar el análisis de *homologías dinámicas* aplicando el costo a) el árbol más parsimonioso tuvo un costo de 5478 y al aplicar el costo b), el árbol de mayor parsimonia fue de costo 5783. En ambos casos la secuencia de este trabajo se agrupó en un mismo clado con otras secuencias de *Phanerochaete chrysosporium* con un alto soporte de Bremer (560) para el costo a (Fig. 58).

Al incluir en los análisis las muestras ambientales (*environmental samples*) disponibles en el GenBank, por medio del BLAST, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Muestras ambientales de filtros de aires en Alemania (GenBank nº GQ851705, GQ851702, GU053824, GU053821, GQ851704, GQ851703, GU054310, GU053835) (Christ *et al.*, 2011). Identidad= 97-99 %; *Query coverage*= 99-100 %.

- Muestra ambiental de compost de residuos agrícolas en China (GenBank nº JX546609) (Zhang *et al.*, 2012 no publicado). Identidad= 97 %; *Query coverage*= 100 %.

Figura 43: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de *Daldinia* e *Hypoxylon* basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 43 secuencias y 1159 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negra y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homología estáticas) se indican en *itálica*. En rojo se muestran las secuencias obtenidas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.



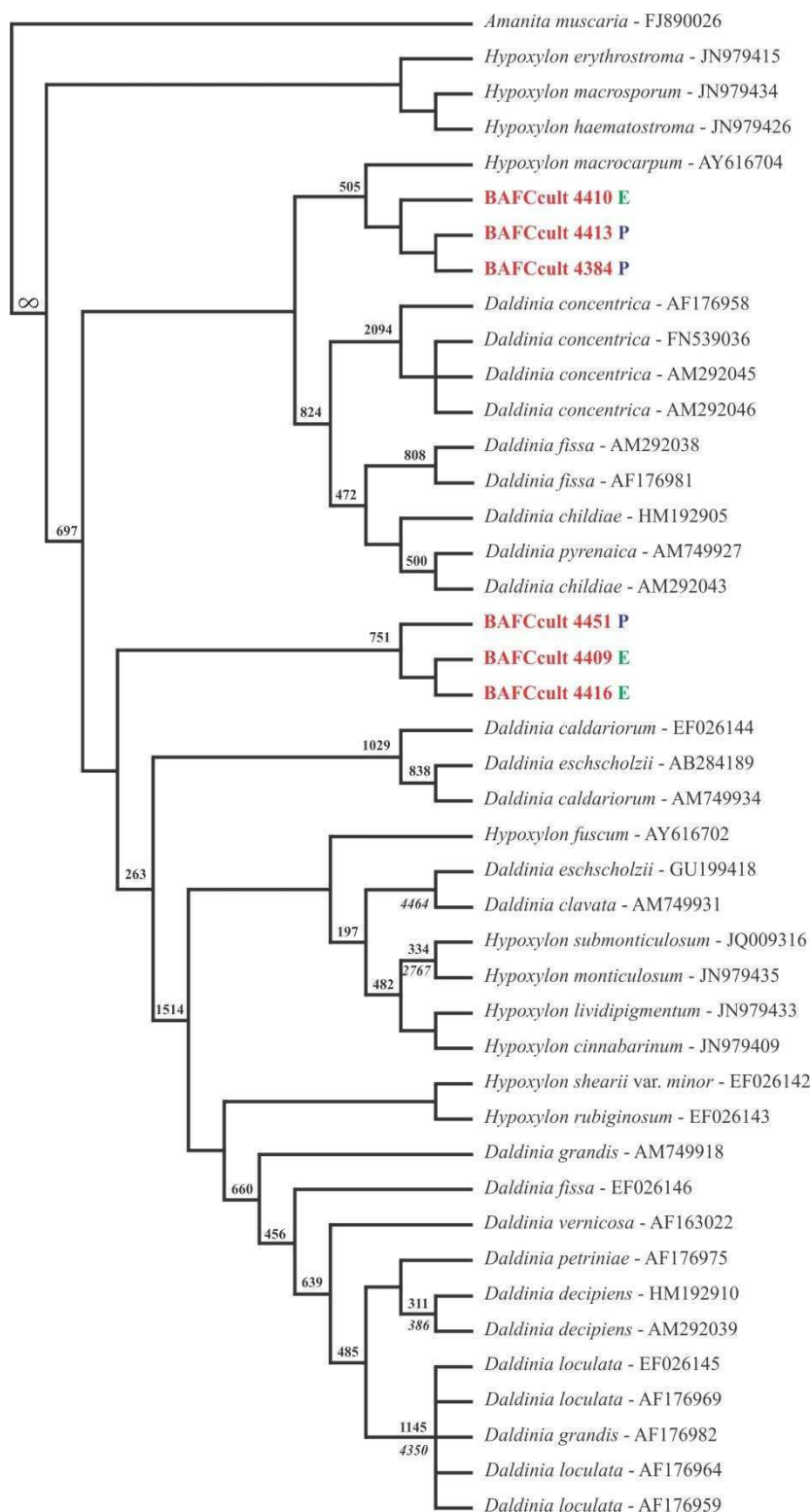
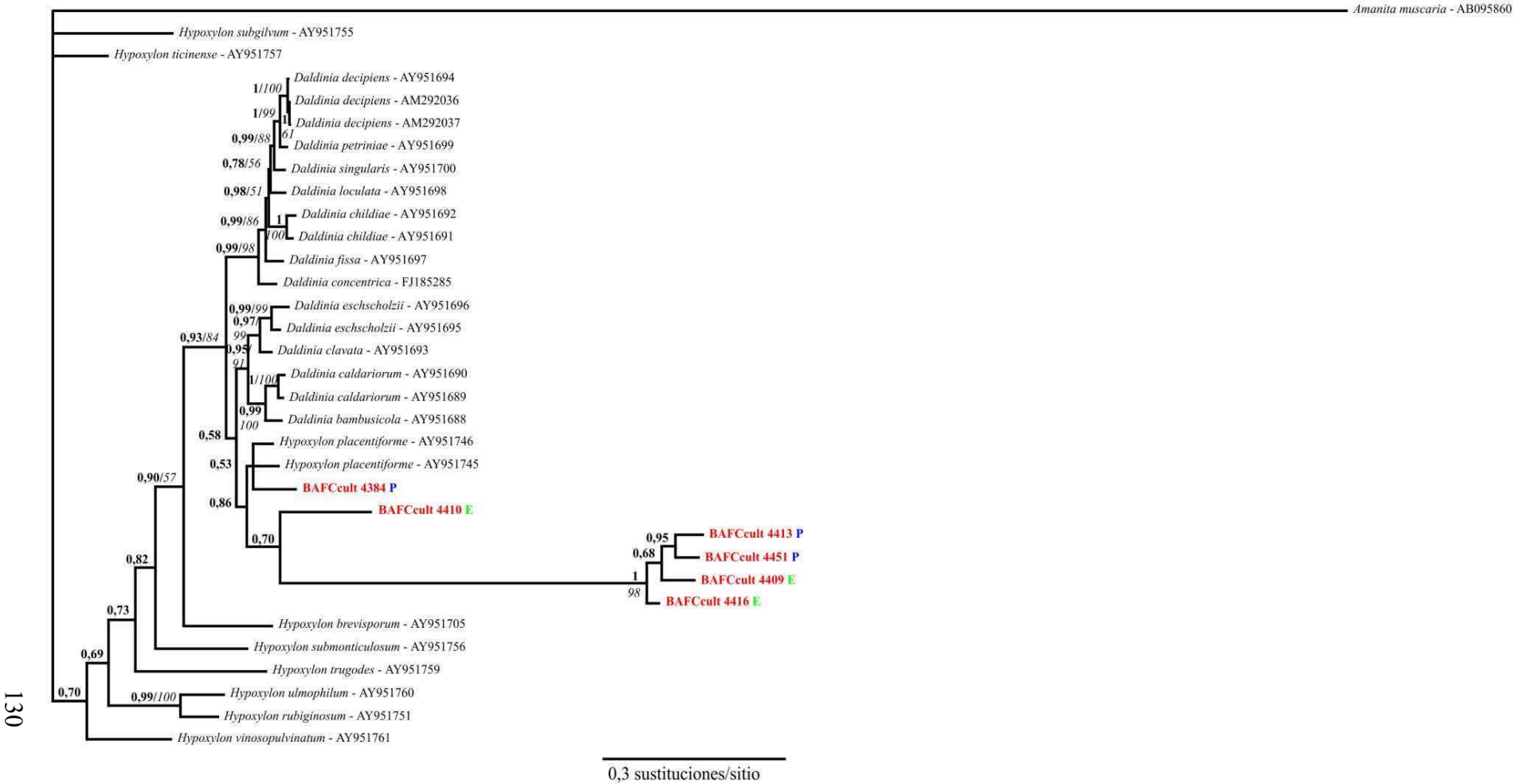


Figura 44: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de *Daldinia* e *Hypoxylon* bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *italica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). En rojo se indican las secuencias obtenidas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno. ∞ : número muy elevado.

Figura 45: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de *Daldinia* e *Hypoxylon* para la región del gen de la β -tubulina a partir de 33 secuencias y 1770 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+I+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en *itálica*. En rojo se muestran las secuencias obtenidas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.



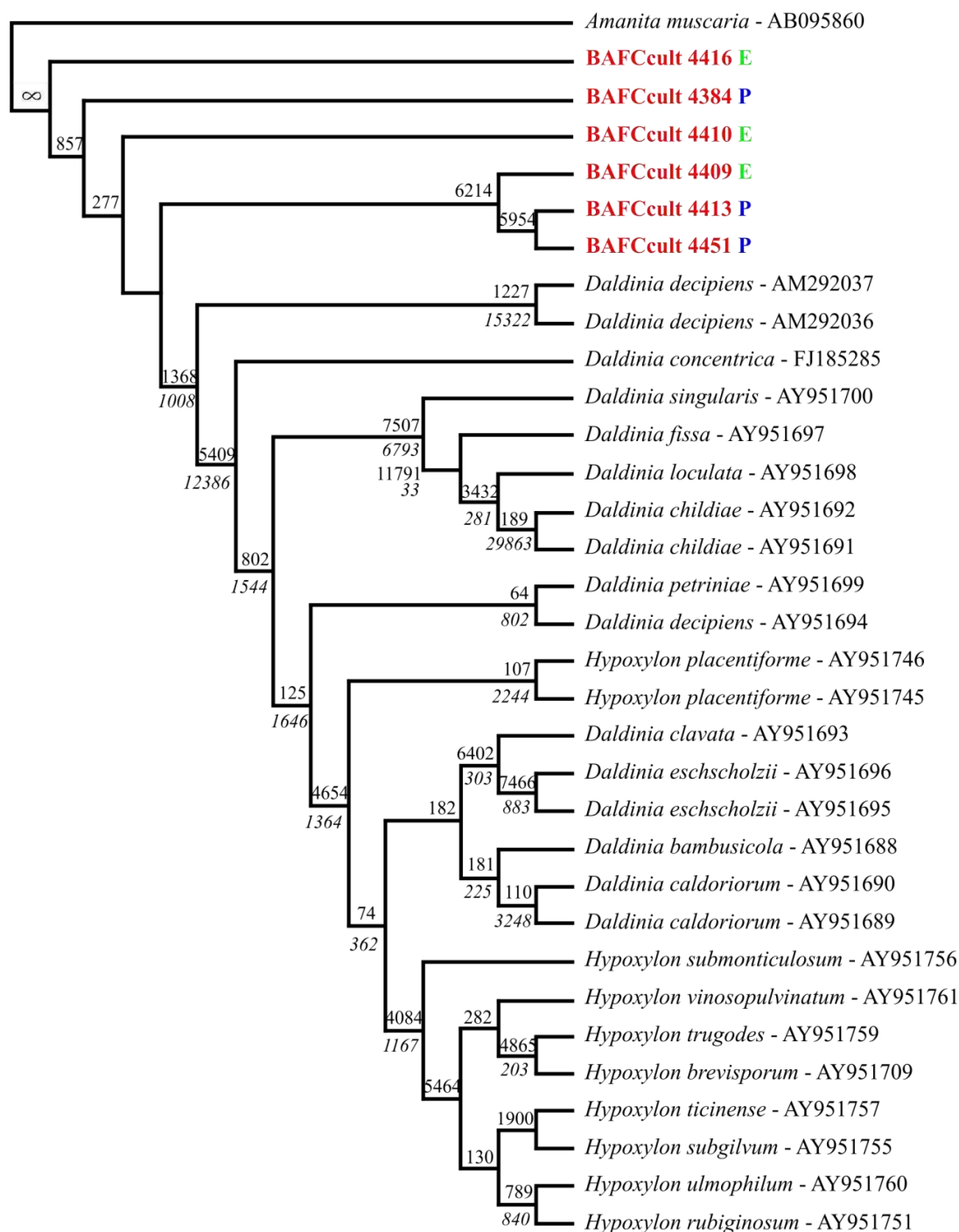
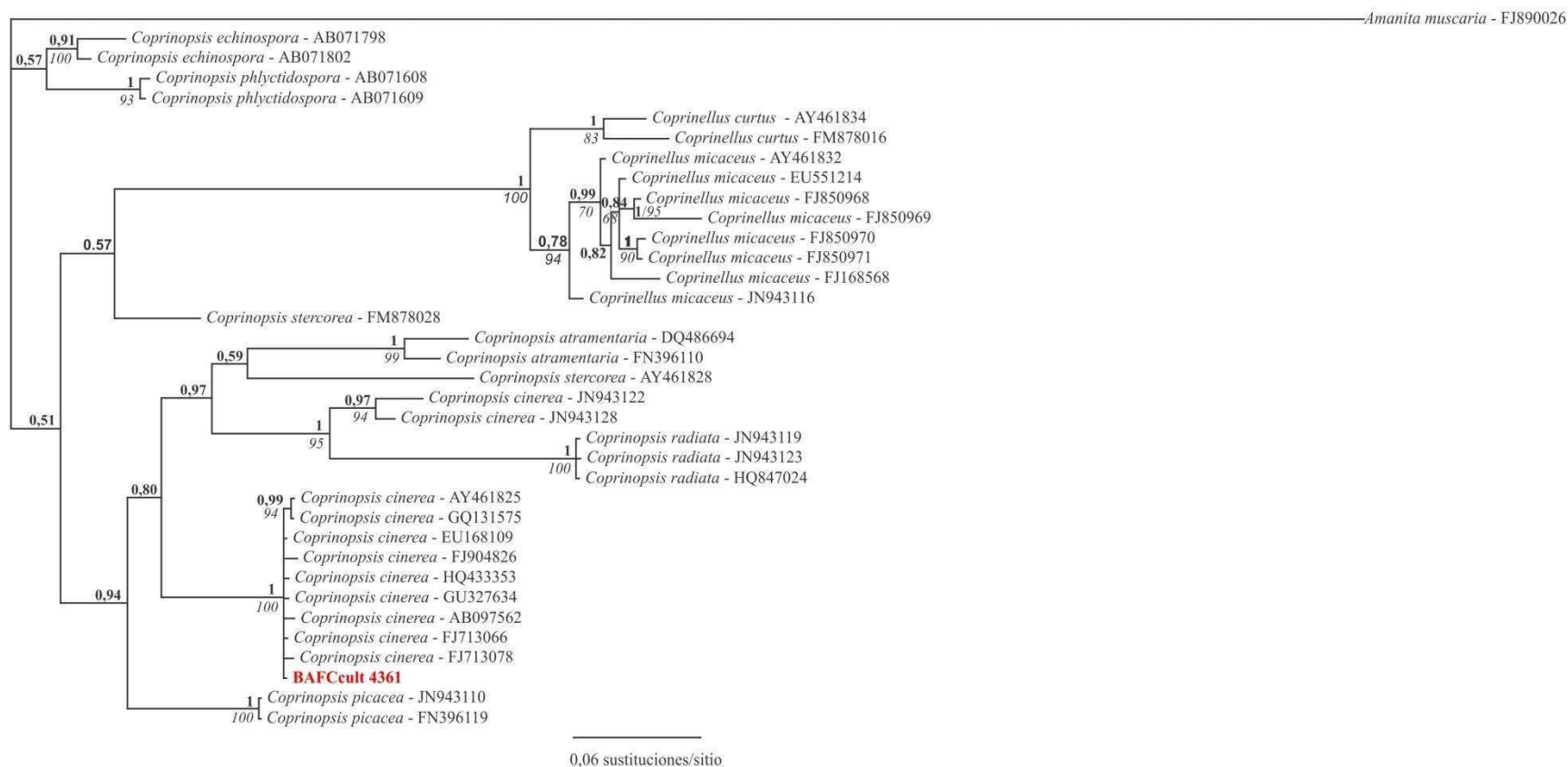


Figura 46: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias del gen de la β -tubulina, para las secuencias de *Nodulisporium* obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *itálica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno. ∞ : número muy elevado.

Figura 47: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de *Coprinopsis* y *Coprinellus* basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 36 secuencias y 827 caracteres nucleotídicos, según el modelo JC+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en *itálica*. En rojo se muestra la secuencia obtenida en este trabajo.



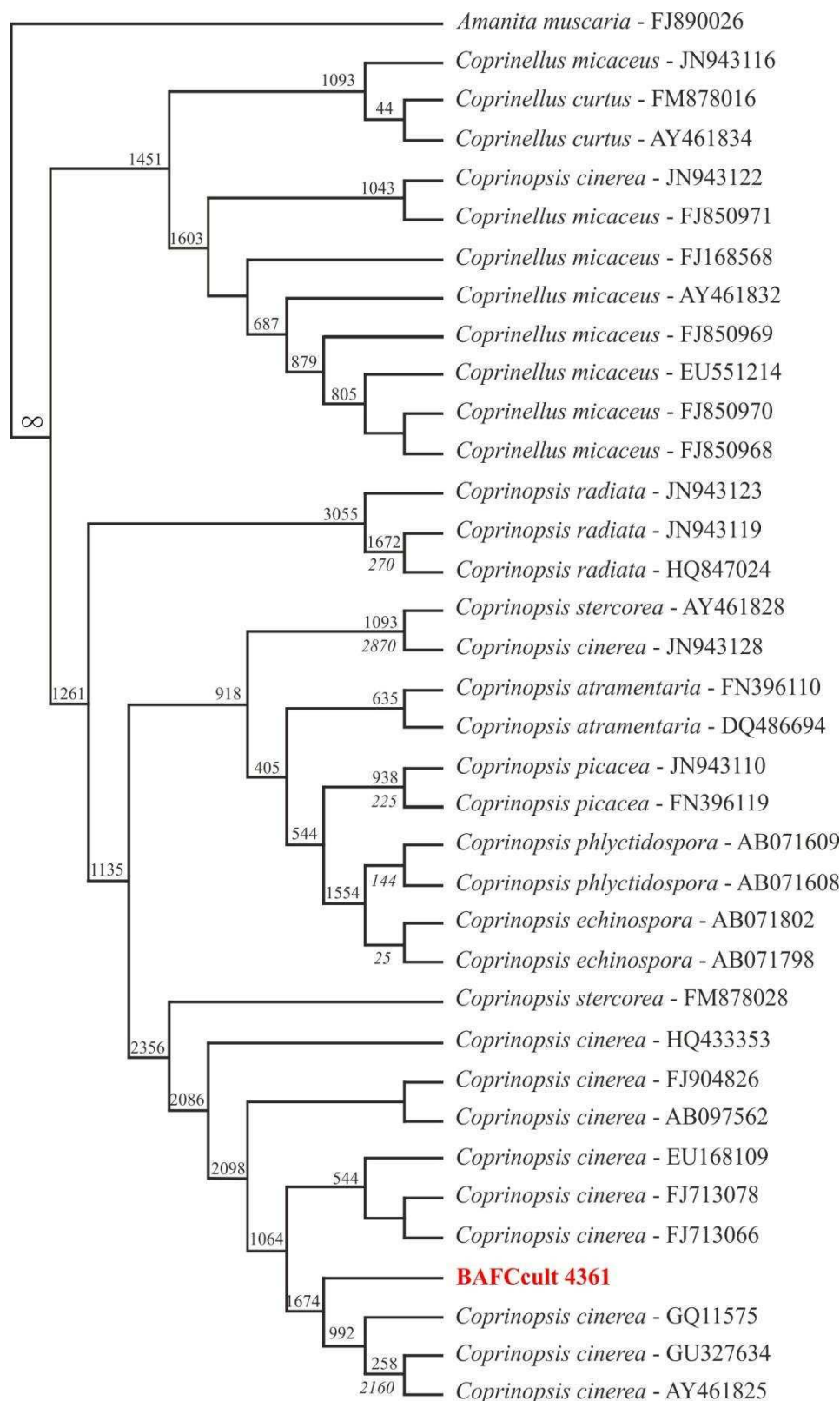
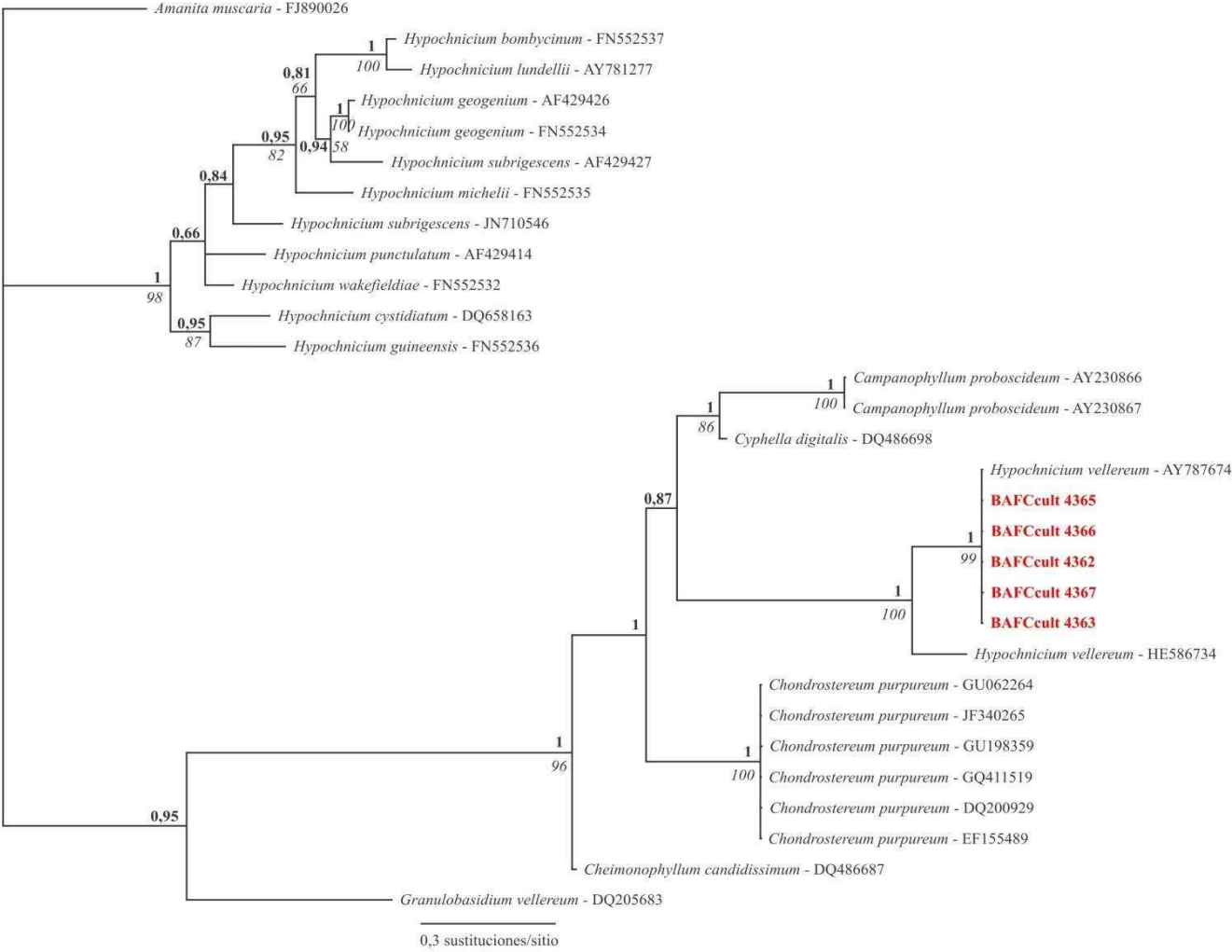


Figura 48: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de *Coprinellus* y *Coprinopsis* bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *italica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). En rojo se indica la secuencia obtenida en este trabajo. ∞ : número muy elevado.

Figura 49: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de *Campanophyllum*, *Cheimonophyllum*, *Chondrostereum*, *Cyphella*, *Granulobasidium* e *Hypochnicium* basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 30 secuencias y 2105 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en itálica. En rojo se muestran las secuencias obtenidas en este trabajo.



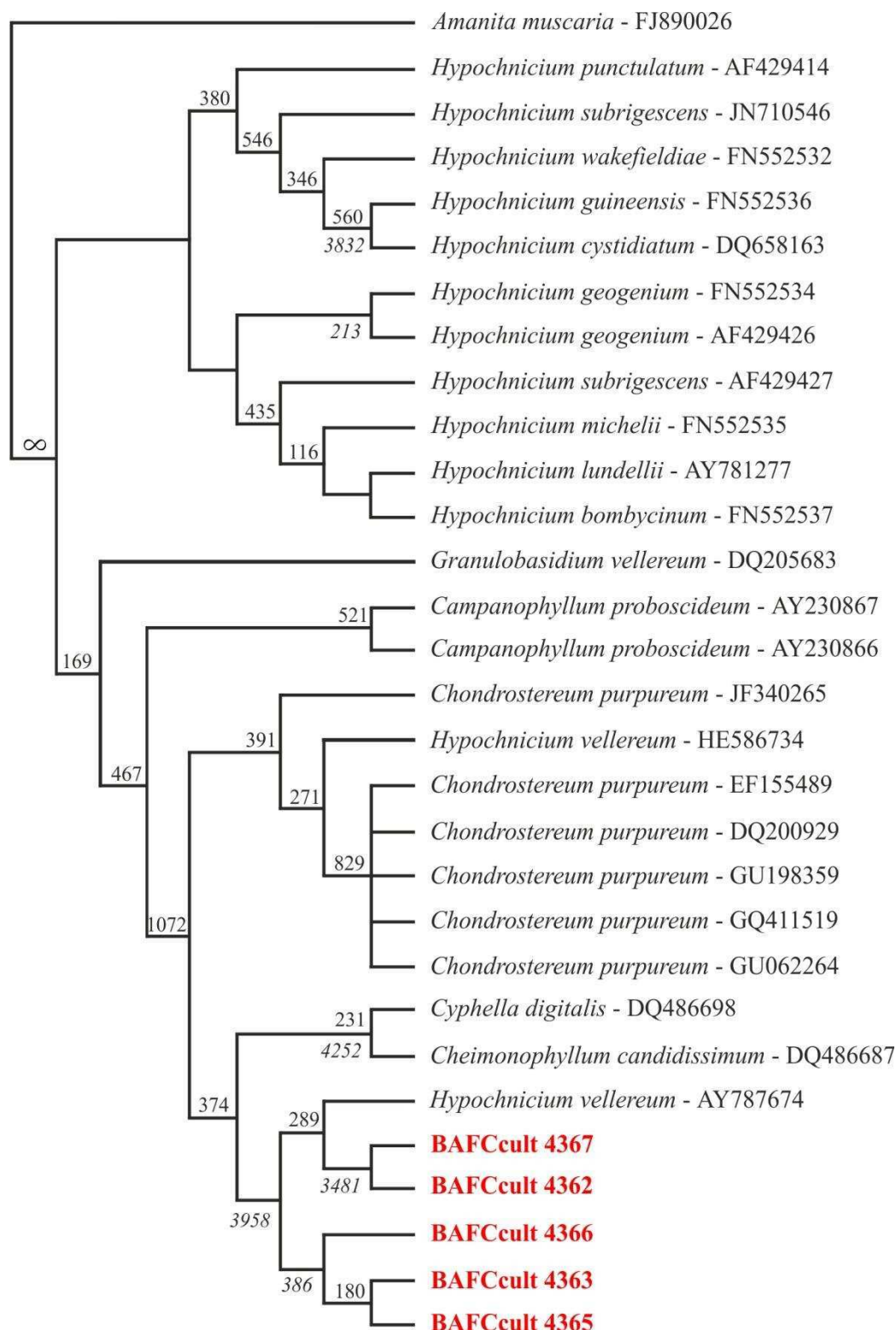
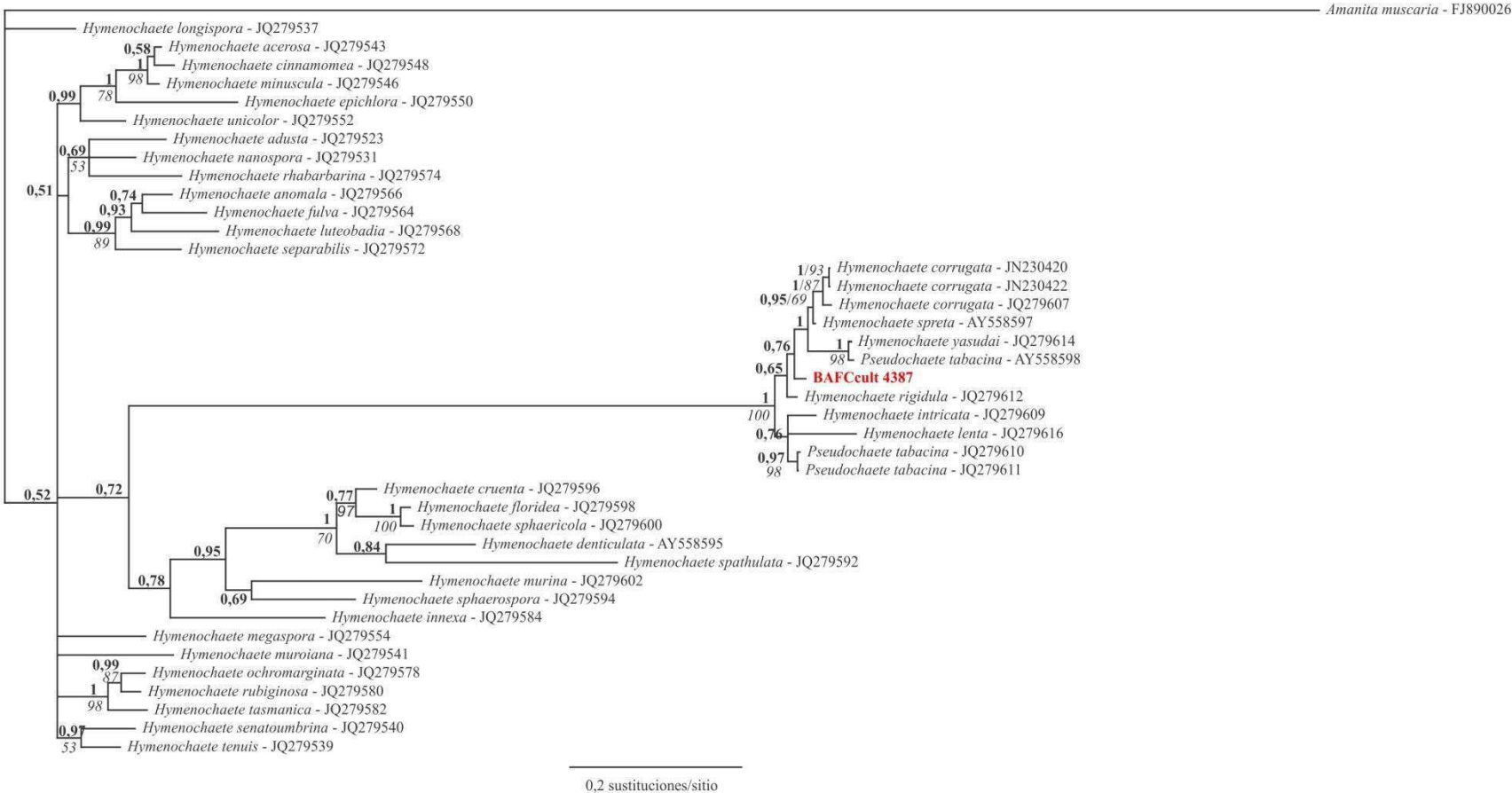


Figura 50: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de *Campanophyllum*, *Cheimonophyllum*, *Chondrostereum*, *Cyphella*, *Granulobasidium* y *Hypochnicium* bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *italica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). En rojo se indican las secuencias obtenidas en este trabajo. ∞ : número muy grande.

Figura 51: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de *Hymenochaete* y *Pseudochaete* basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 41 secuencias y 1007 caracteres nucleotídicos, según el modelo T3P+G. Las probabilidades a posterior se indican sobre las ramas en **negrita** y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en *itálica*. En rojo se muestra la secuencia obtenida en este trabajo.



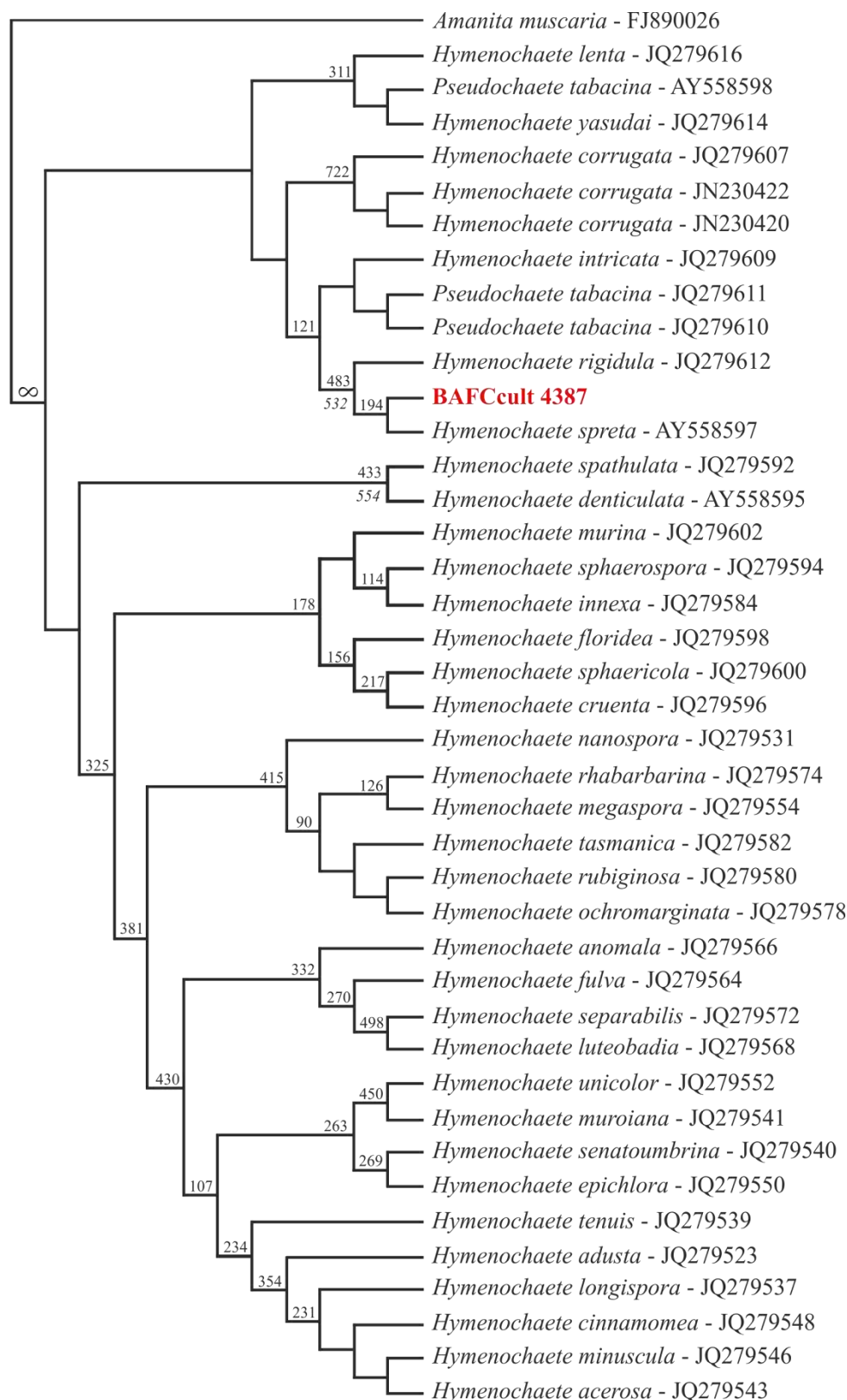
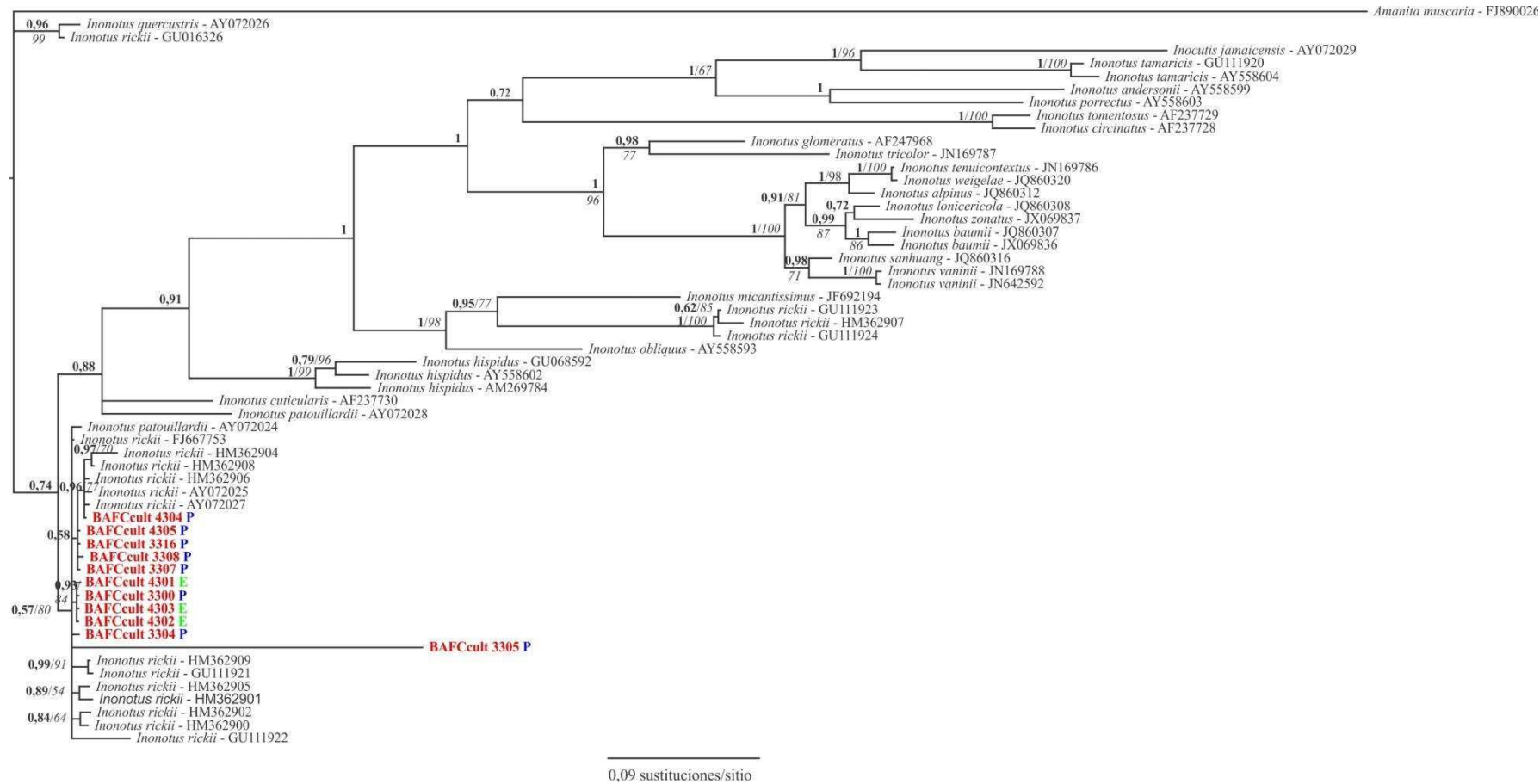


Figura 52: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de *Hymenochaete* y *Pseudochaete* bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *italica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). En rojo se indica la secuencia obtenida en este trabajo. ∞ : número muy grande.

Figura 53: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies de *Inocutis* e *Inonotus* basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 57 secuencias y 1106 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en itálica. En rojo se muestran las secuencias obtenidas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.



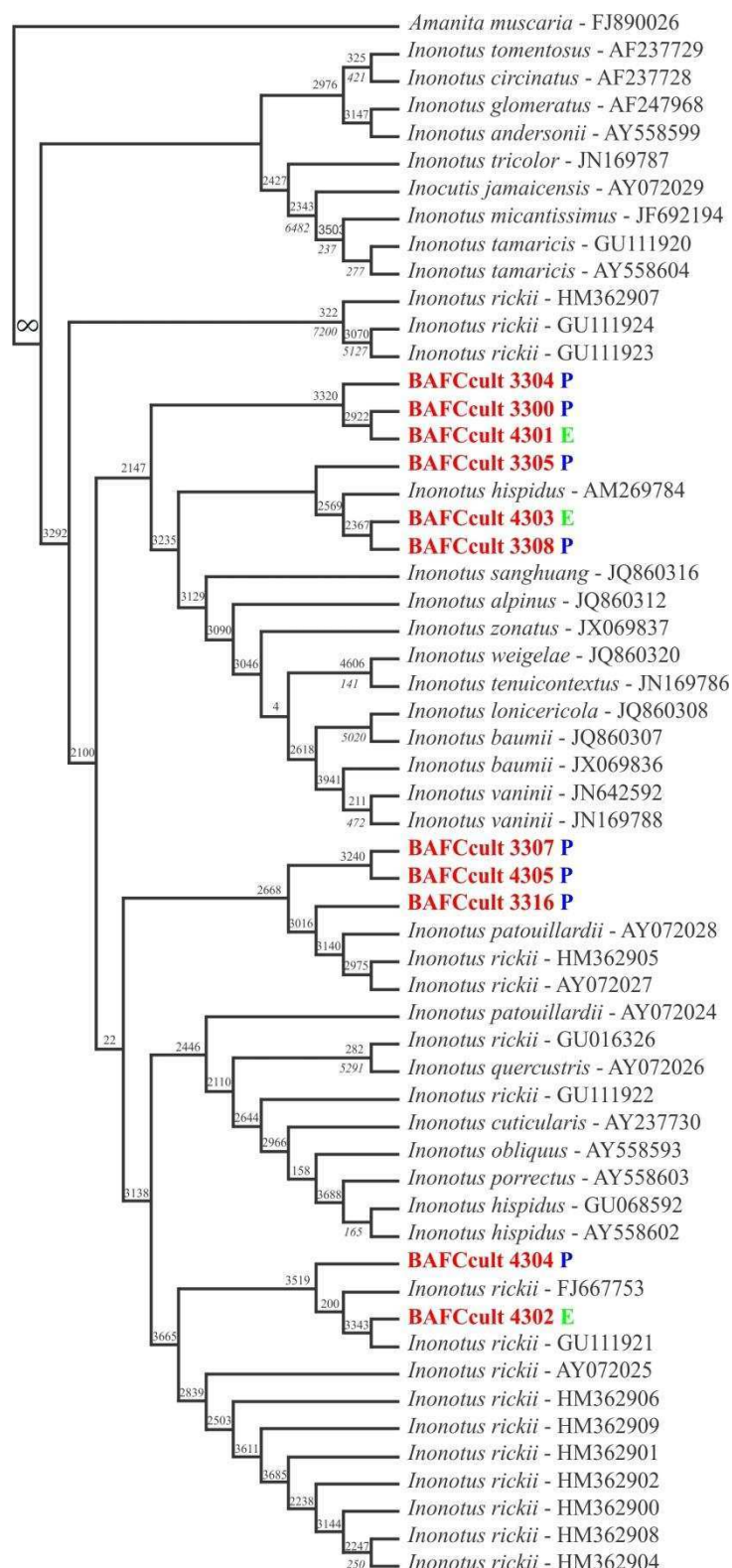
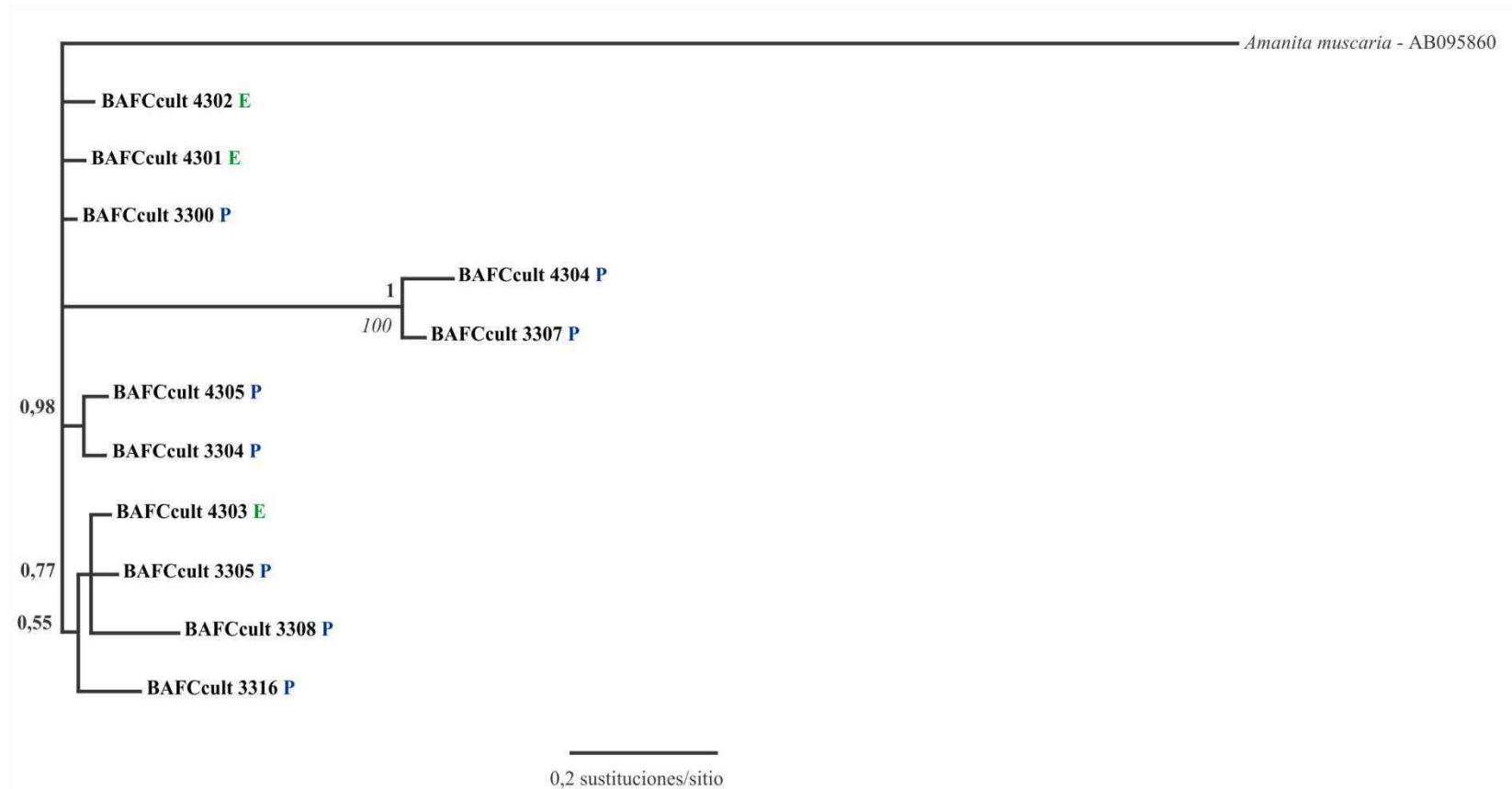


Figura 54: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de *Inocutis* e *Inonotus* bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *itálica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). En rojo se indican las secuencias obtenidas en este trabajo. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno. ∞ : número muy elevado.

Figura 55: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) para las secuencias de *Inonotus rickii* obtenidas, para la región del gen de la β -tubulina, a partir de 12 secuencias y 615 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en itálica. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.



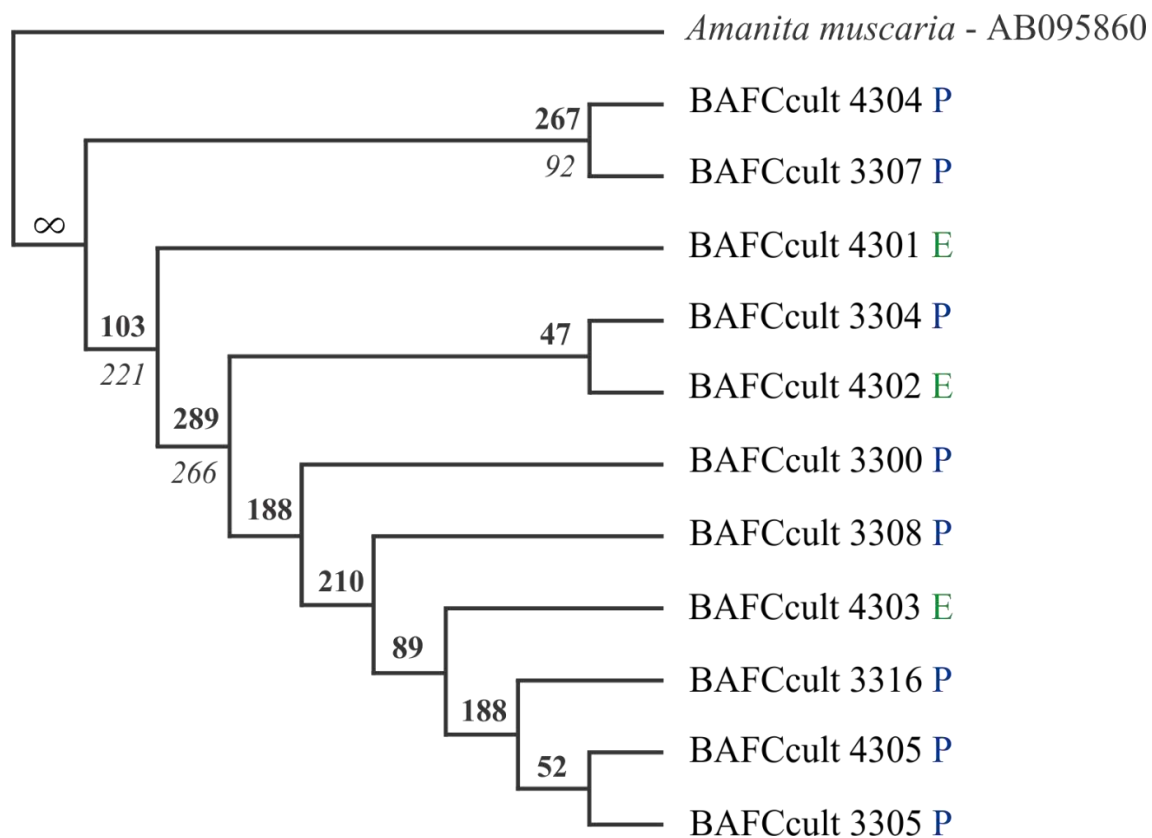
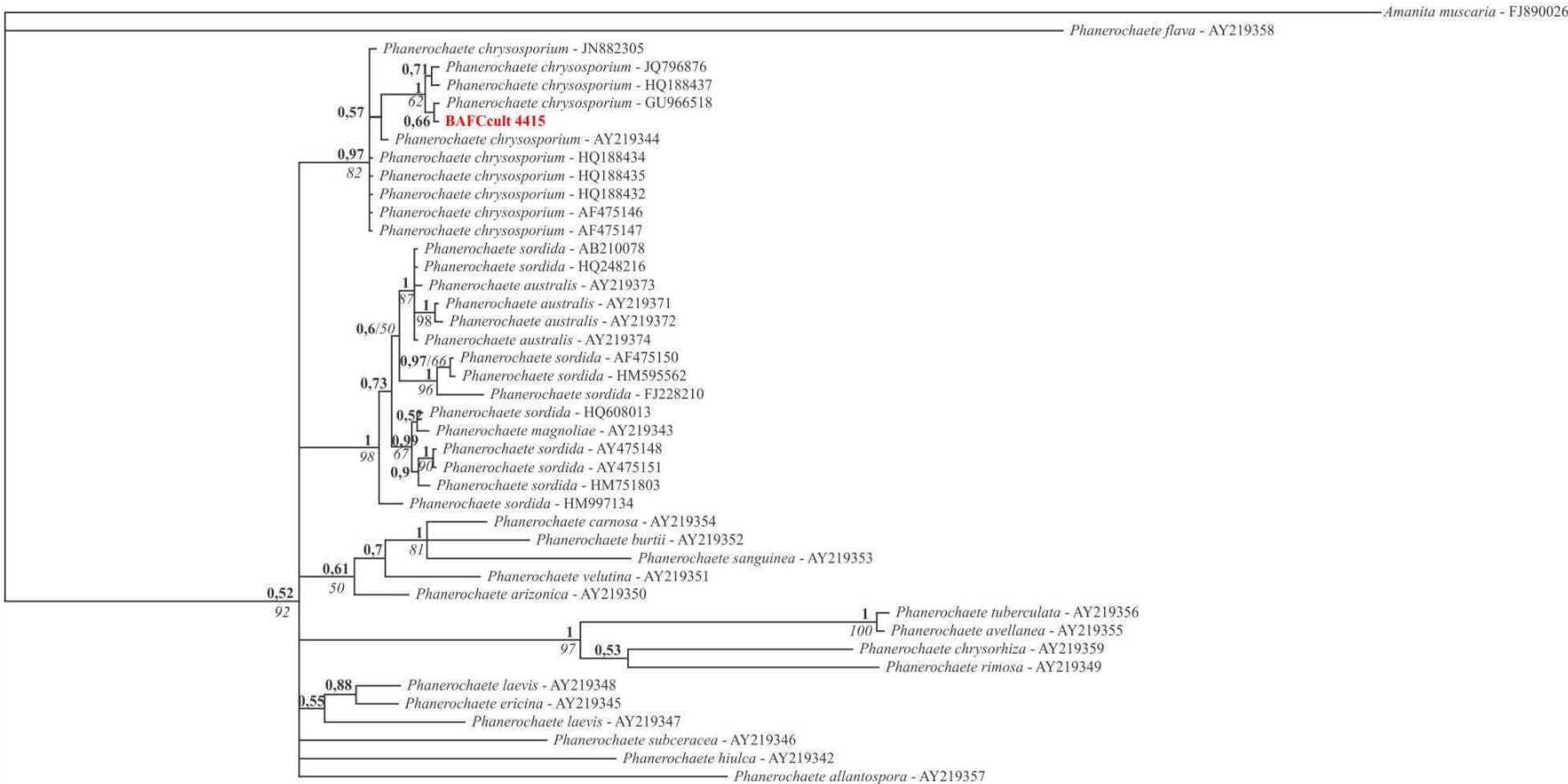


Figura 56: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias del gen de la β -tubulina para las secuencias de *Inonotus rickii* obtenidas bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *italica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno. ∞ : número muy elevado.

Figura 57: Inferencia bayesiana. Árbol consenso de la mayoría (50%) de especies de *Phanerochaete* basadas en las regiones ITS1/ITS2, a partir de 43 secuencias y 1080 caracteres nucleotídicos, según el modelo K2P+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50% (a partir del análisis de homologías estáticas) se indican en itálica. En rojo se muestra la secuencia obtenida en este trabajo.



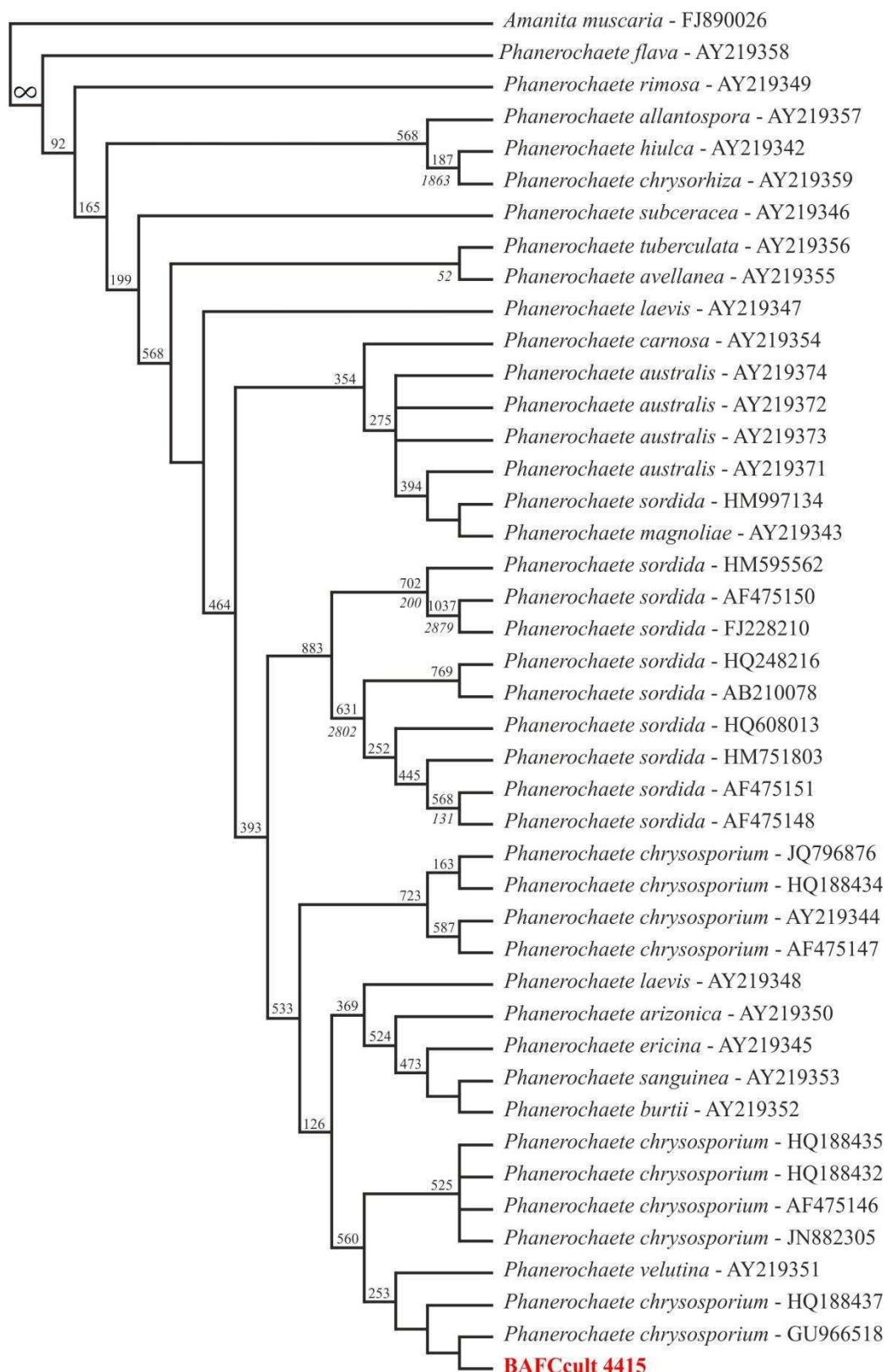


Figura 58: Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias ITS de especies de *Phanerochaete* bajo análisis de máxima parsimonia por homologías dinámicas. Sobre las ramas se muestran los soportes de Bremer positivos para el costo a). Los valores bajo las ramas en *italica* indican los soportes de Bremer para los clados que permanecieron al aplicar el costo b). En rojo se indica la secuencia obtenida en este trabajo. ∞ : número muy elevado.

4. Registro de presencia de oxidasas extracelulares

Se evaluó la actividad de oxidasas para las cepas de basidiomicetes y Xylariales aisladas en medio con ácido tánico, medio con ácido gálico, medio con tirosina, medio con guayacol y medio con paracresol. En la Tabla 18 y las Figuras 59-66 detallan los resultados de los ensayos realizados.

Se registró la presencia de oxidasas extracelulares principalmente en la cepa de *Hymenochaete* sp. e *Inonotus rickii* endofítico. *Phanerochaete chrysosporium*, por el contrario, no evidenció reacción positiva en ningún medio. *Coprinopsis cinerea* y *Granulobasidium vellereum* mostraron poca o nula reacción de oxidasas (*C. cinerea* sólo en medio con guayacol) y esto estuvo en concordancia con la ausencia de pérdida de peso de la madera en presencia de estas cepas. *Hymenochaete* sp. produjo reacciones positivas de oxidasas aunque esto no se vio reflejado en los ensayos de degradación de madera de plátano en los cuales causó una pérdida de peso no significativa. Ambas cepas de *Nodulisporium* presentaron reacción de oxidasas positivas en medio con ácido gálico y causaron relativamente altos porcentajes de pérdida de peso en la madera (cerca de 20%). La cepa de *Trichosporon sporotrichoides* no presentó reacción positiva en ningún medio de oxidasas.

	Ácido gálico	Ácido tánico	Guayacol	Paracresol	Tirosina
<i>Nodulisporium</i> sp. (BAFCcult 4416) E	++ <i>c</i>	- <i>c</i>	-	-	- <i>c</i>
<i>Nodulisporium</i> sp. (BAFCcult 4384) P	+++	++ <i>c</i>	-	-	- <i>c</i>
<i>C. cinerea</i> (BAFCcult 4361) E	-	-	+++	-	- <i>c</i>
<i>G. vellereum</i> (BAFCcult 4362) E	-	-	-	- <i>c</i>	-
<i>Hymenochaete</i> sp. (BAFCcult 4387) P	+++	+++ <i>c</i>	-	++	+++ <i>c</i>
<i>I. rickii</i> (BAFCcult 4402) E	+++	+++	++	++ <i>c</i>	++
<i>P. chrysosporium</i> (BAFCcult 4415) E	- <i>c</i>	-	-	- <i>c</i>	- <i>c</i>
<i>T. sporotrichoides</i> (BAFCcult 4404) E	- <i>c</i>	- <i>c</i>	-	-	- <i>c</i>

Tabla 18: Producción *in vitro* de oxidasas por parte de cepas endofíticas y patogénicas aisladas de madera de *P. acerifolia*. El ensayo se realizó durante 1 semana a 24°C en oscuridad. - = indica ausencia de zona de difusión; + = indica presencia de zona de difusión. El número de signos + da una medida cualitativa de la intensidad de la zona de difusión. *c*: con crecimiento micelial. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.

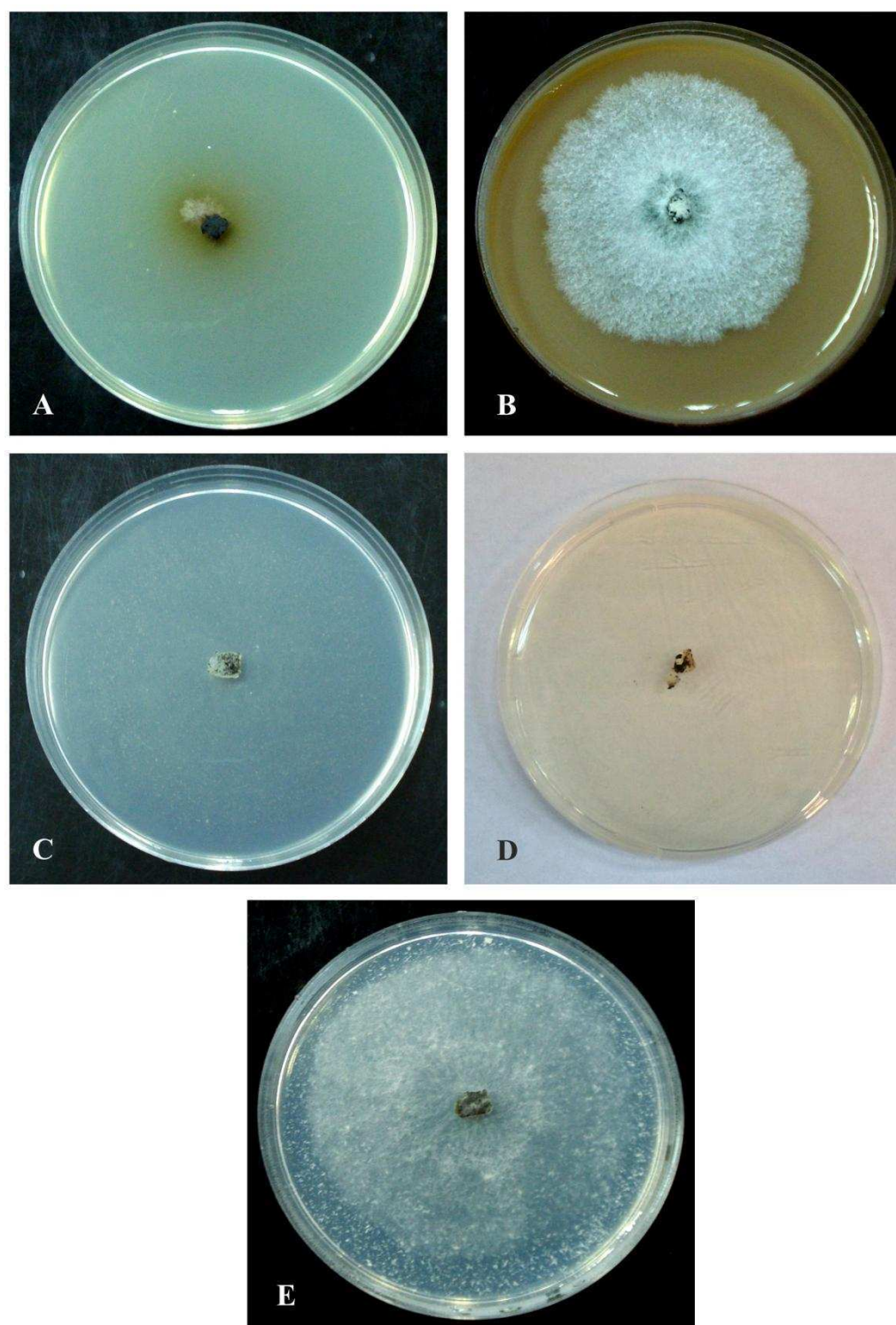


Figura 59: *Nodulisporium* sp. endofítico. BAFCcult 4416. (A) reacción con ácido gálico: +++, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, con crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.

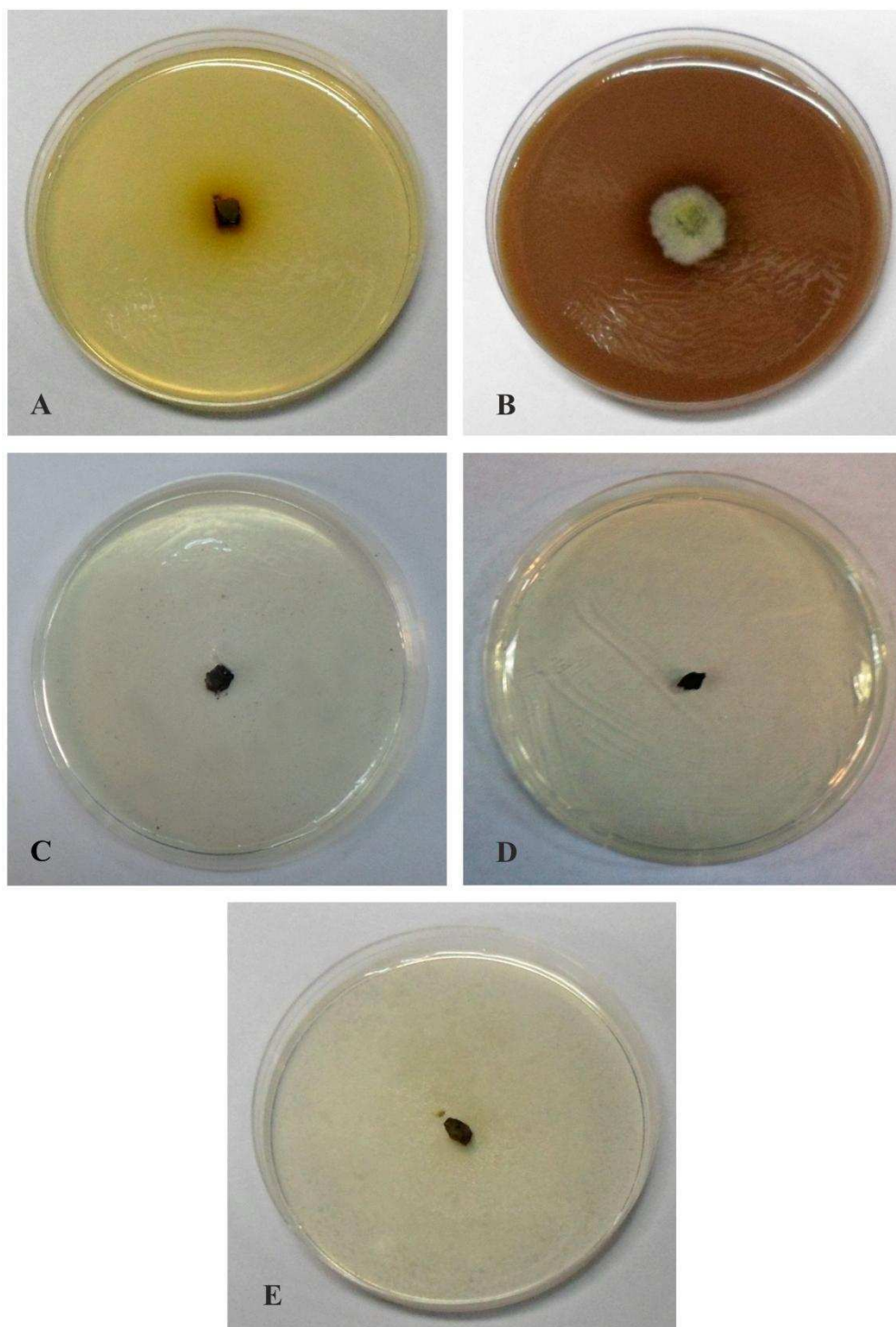


Figura 60: *Nodulisporium* sp. patógeno BAFCcult 4384. **(A)** reacción con ácido gálico: +++, con crecimiento. **(B)** reacción con ácido tánico: ++, con crecimiento. **(C)** reacción con guayacol: -, sin crecimiento. **(D)** reacción con paracresol: -, sin crecimiento. **(E)** reacción con tirosina: -, con crecimiento.

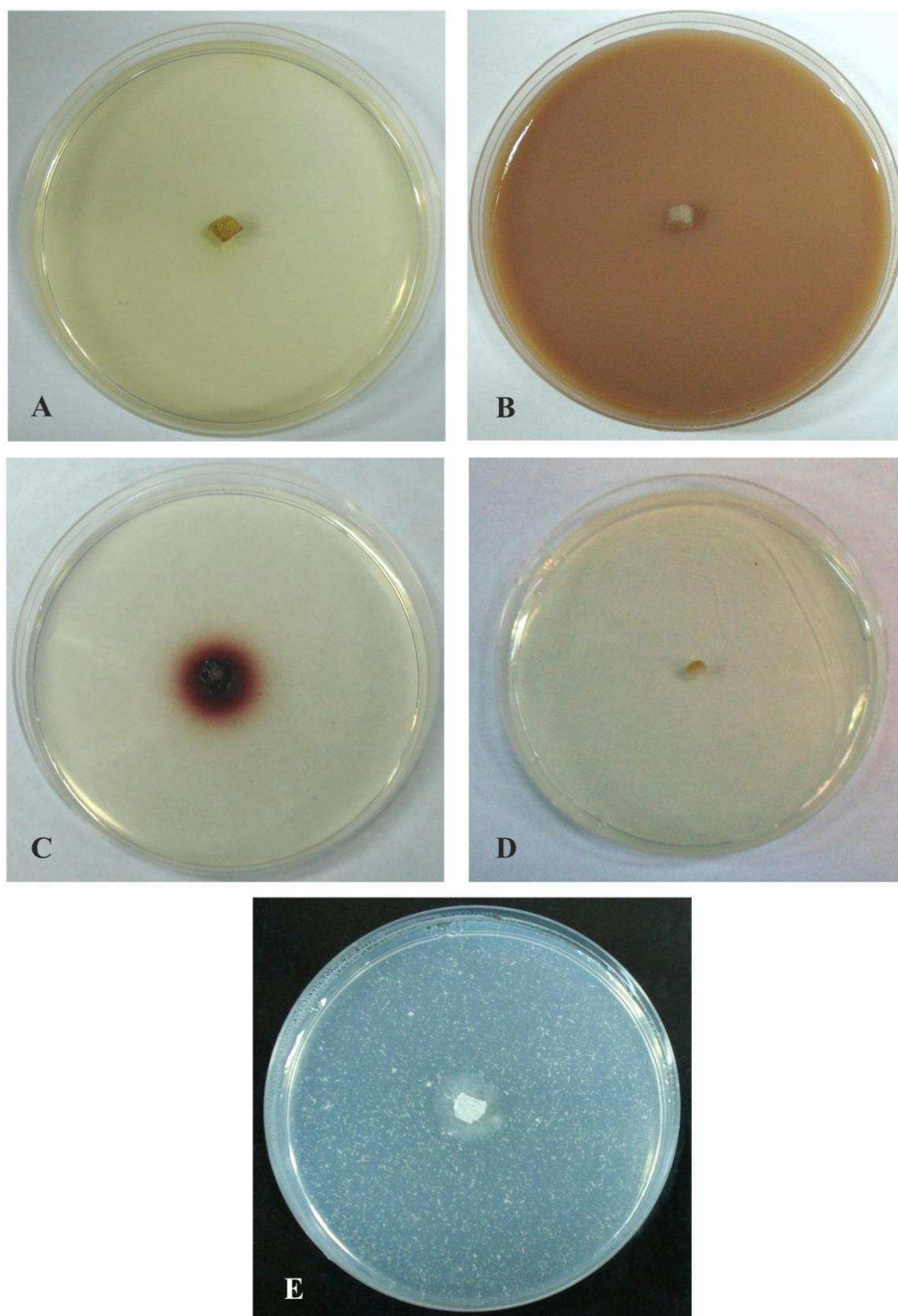


Figura 61: *Coprinopsis cinerea*. (A) reacción con ácido gálico: -, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: +++, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.

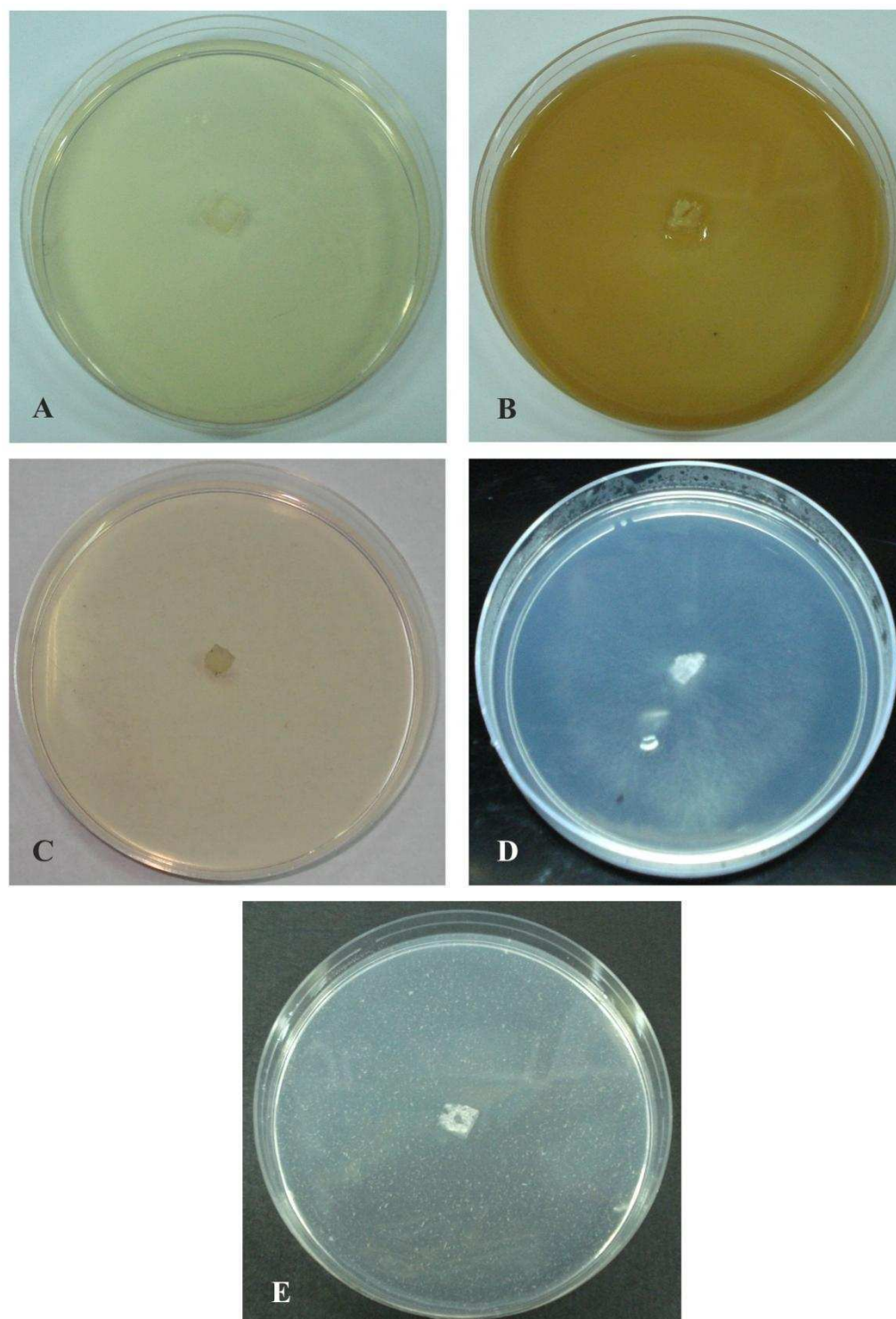


Figura 62: *Granulobasidium vellereum*. (A) reacción con ácido gálico: -, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, con crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, sin crecimiento.

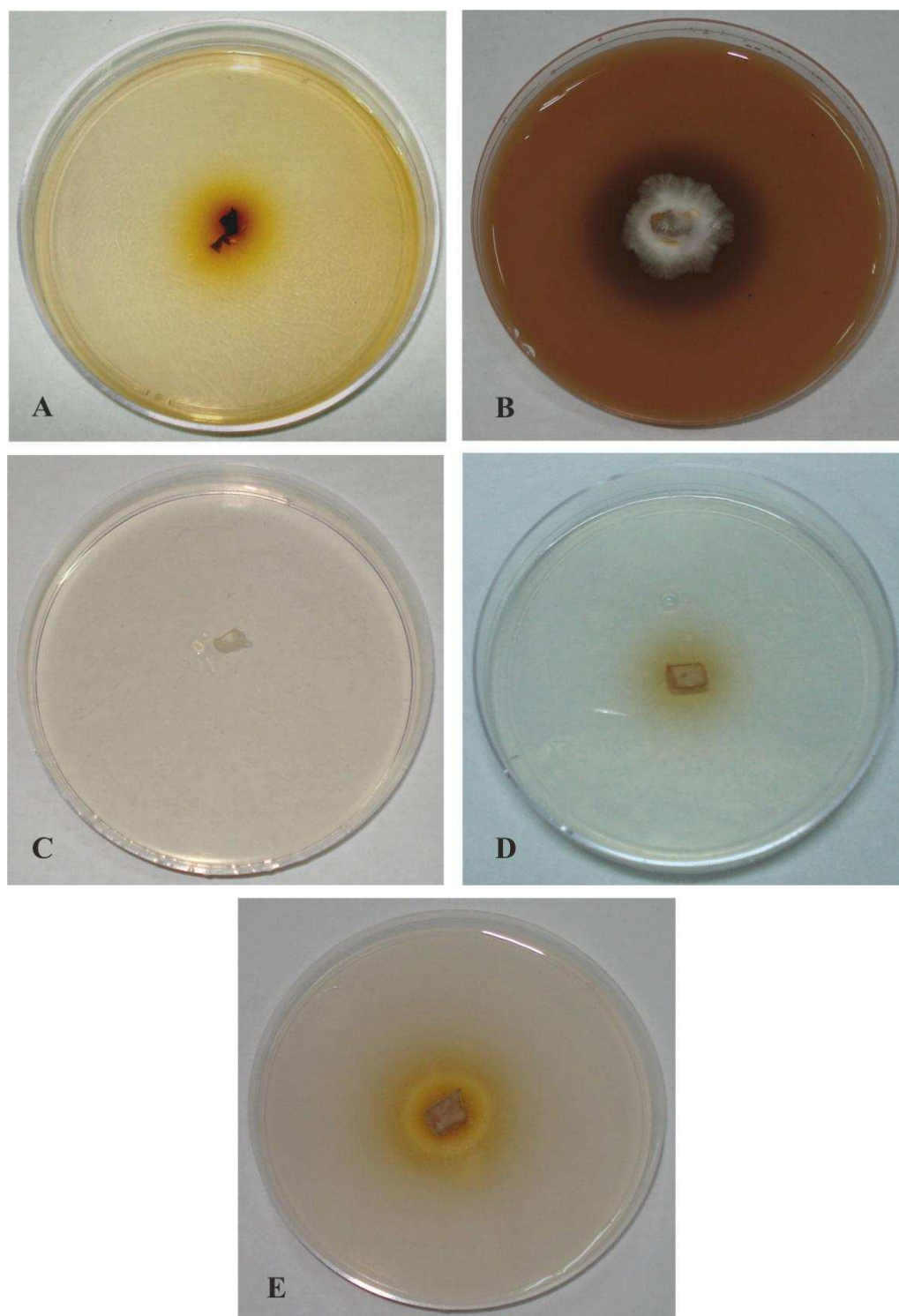


Figura 63: *Hymenochaete* sp. (A) reacción con ácido gálico: +++, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: +++, con crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: ++, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: +++, con crecimiento.

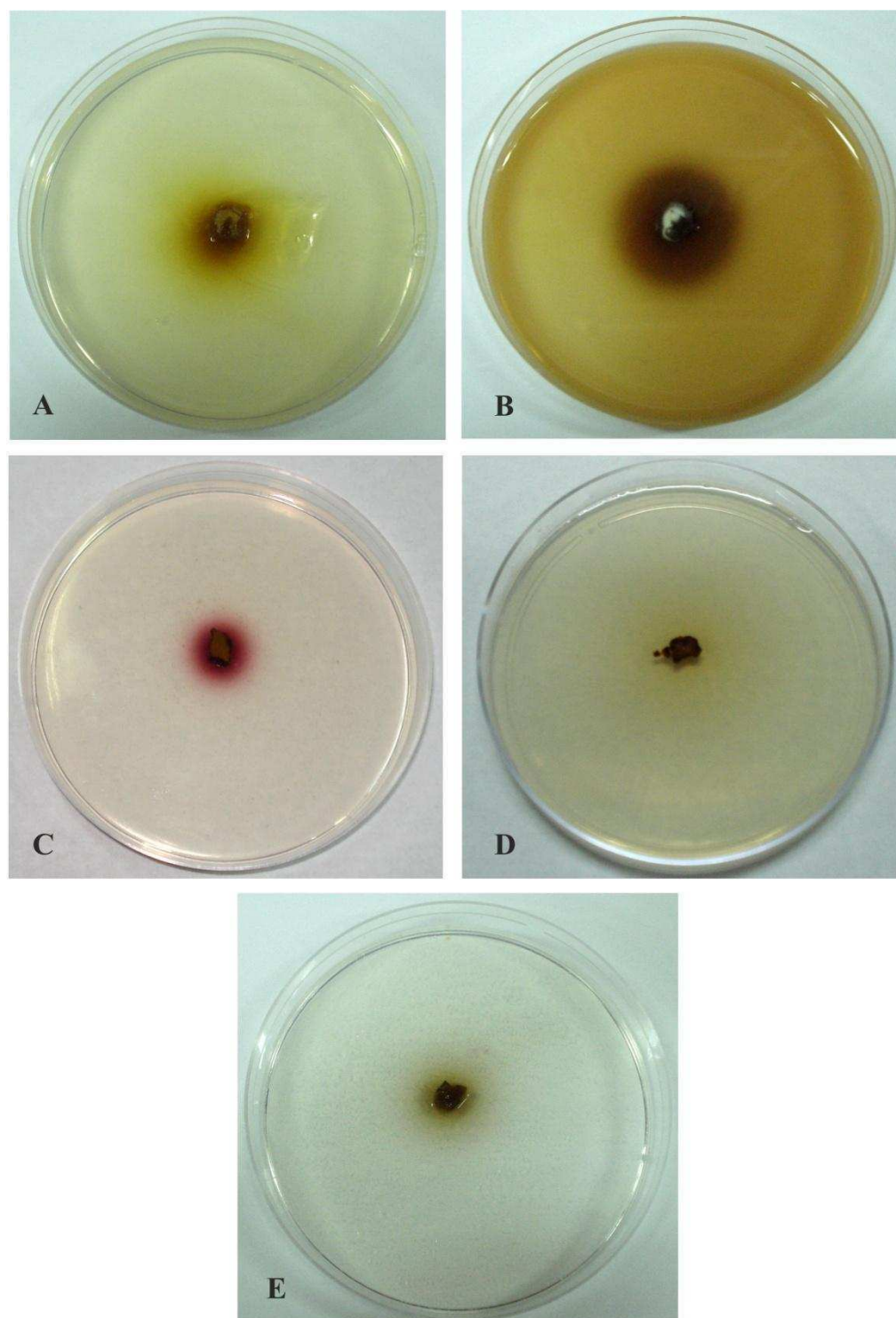


Figura 64: *Inonotus rickii* endofítico. (A) reacción con ácido gálico: +++, sin crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: +++, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: ++, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: ++, con crecimiento. (E) reacción con tirosina: ++, sin crecimiento.

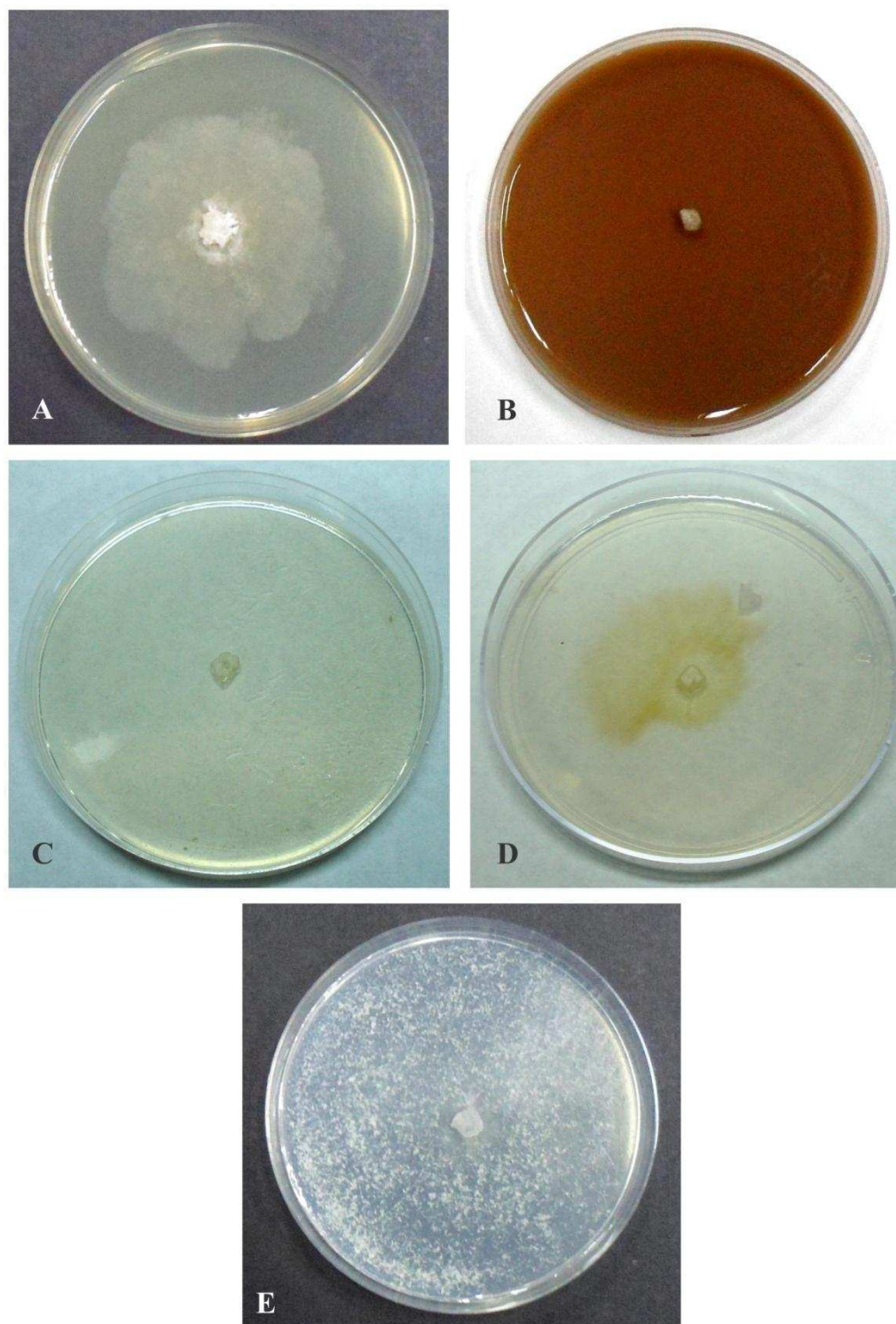


Figura 65: *Phanerochaete chrysosporium*. (A) reacción con ácido gálico: -, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, sin crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, con crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.

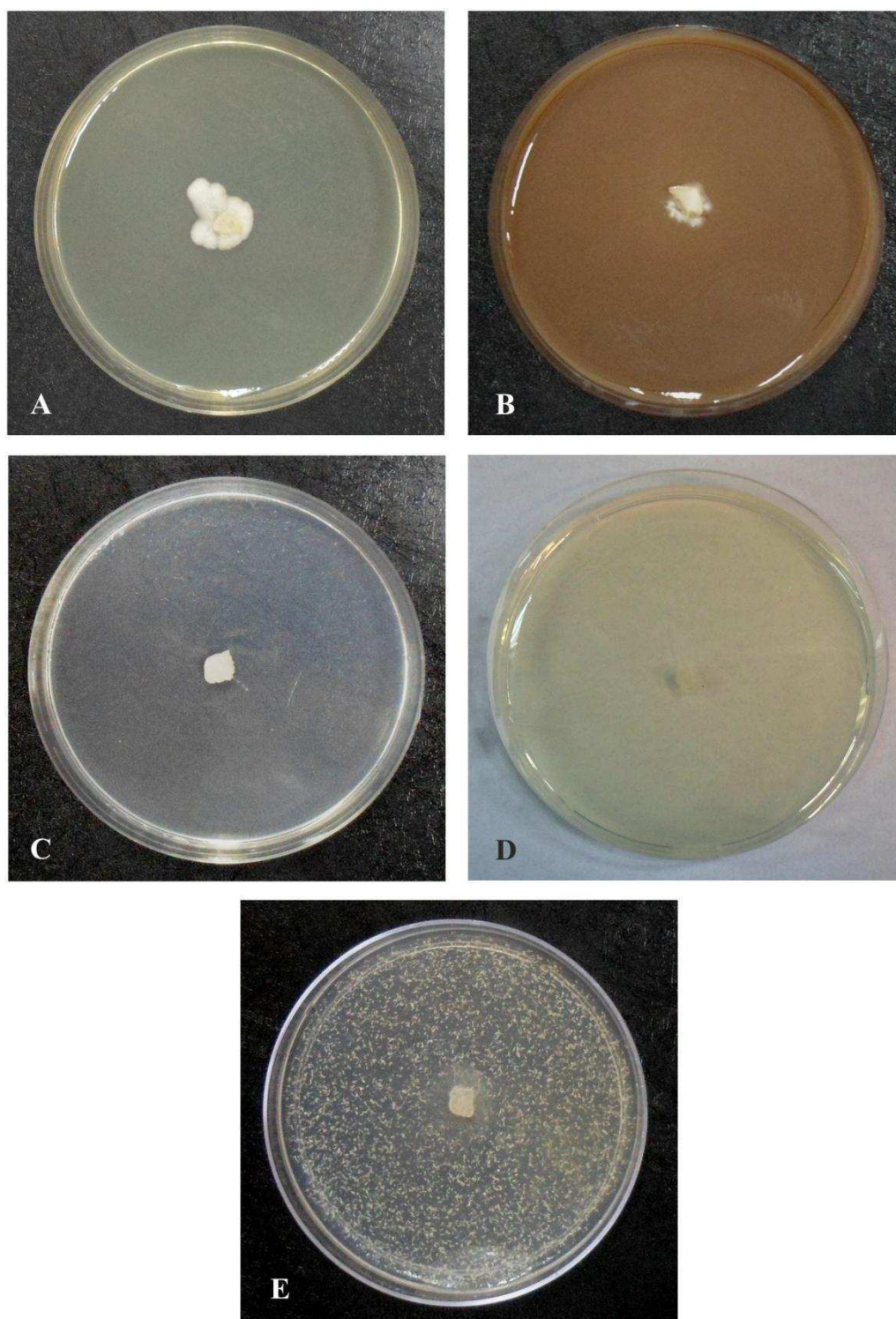


Figura 66: *Trichosporon sporotrichoides*. (A) reacción con ácido gálico: -, con crecimiento. (B) reacción con ácido tánico: -, con crecimiento. (C) reacción con guayacol: -, sin crecimiento. (D) reacción con paracresol: -, sin crecimiento. (E) reacción con tirosina: -, con crecimiento.

5. Ensayos de degradación *in vitro*

Se evaluó *in vitro* la pérdida de peso seco causada por los basidiomicetes detectados y las cepas de *Nodulisporium* (Xylariaceae) con el fin de evaluar la capacidad degradadora de estos organismos en madera de plátano.

Luego de 3 meses de incubación en oscuridad a 24°C, las probetas de madera fueron retiradas y limpiadas en condiciones estériles para su posterior secado y pesado. En todos los tratamientos, la superficie de las probetas se hallaba cubierta enteramente por micelio al final del ensayo (Fig. 67).

Las diferentes cepas produjeron distintos valores de pérdida de peso en la madera (Tabla 19; Fig. 68). La cepa de *Phanerochaete chrysosporium* (BAFCcult 4415) resultó ser la más agresiva, causando una pérdida de peso de poco más del 20%. Las cepas de *Nodulisporium* sp. (BAFCcult 4384 y 4416) causaron pérdidas de peso ligeramente menores. *Granulobasidium vellereum* (BAFCcult 4362), aislado como endofito de madera, produjo la menor pérdida de peso, menor a 1%, semejante al valor control. El rango de pérdidas de peso registradas para el resto de las cepas evaluadas fue de entre y 2 y 14% aproximadamente.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al analizarlos con ANOVA ($F= 315,43$; $p<0,01$, $gl= 7$). Cuando se compararon las medias por contrastes, las diferencias entre los valores de pérdida de peso seco resultaron significativas ($p<0,01$) para todos los tratamientos a excepción de las probetas tratadas con *Granulobasidium vellereum* ($p<0,01$) (Tabla 1' anexo).

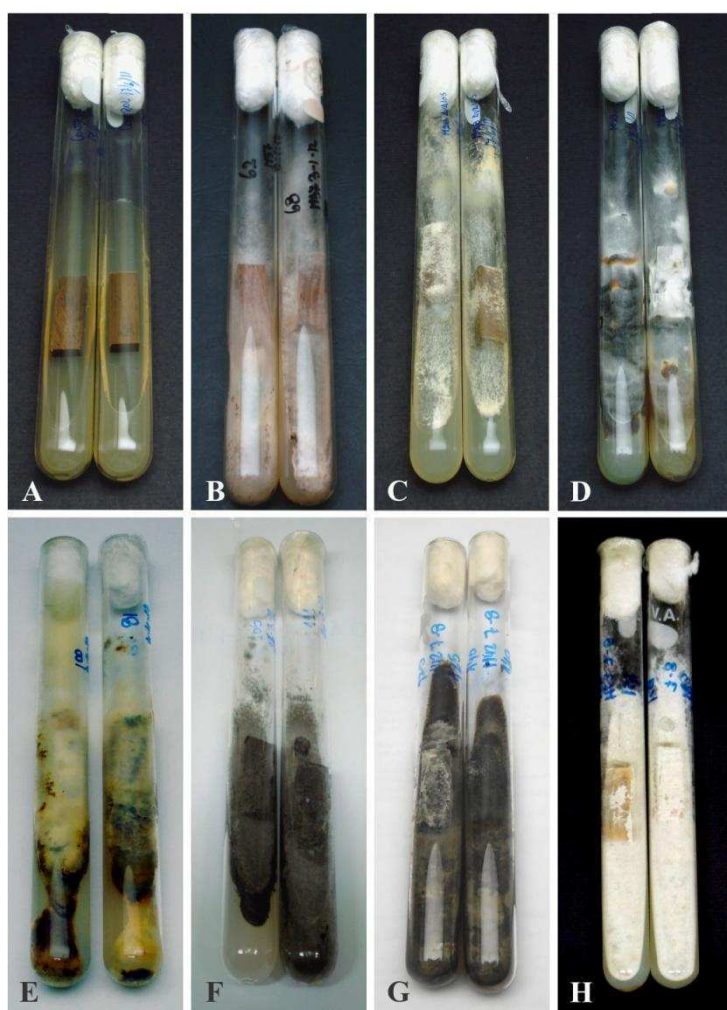


Figura 67: Aspecto de los tubos al finalizar el ensayo de degradación. – (A) Control. – (B) *C. cinerea*. – (C) *G. vellereum*. (D) *Hymenochaete* sp. – (E) *I. rickii* endofítico. – (F) *Nodulisporium* sp. endofítico BAFCcult 4416. – (G) *Nodulisporium* sp. patógeno BAFCcult 4384. – (H) *P. chrysosporium*.

Tratamiento	Promedio (%)	DE (%)
<i>C. cinerea</i> (BAFCcult 4361) E	1,73	0,58
<i>G. vellereum</i> (BAFCcult 4362) E	0,41	0,56
<i>Hymenochaete</i> sp. (BAFCcult 4387) P	3,11	1,31
<i>I. rickii</i> (BAFCcult 4302) E	13,68	2,88
<i>Nodulisporium</i> sp. (BAFCcult 4384) P	16,29	4,55
<i>Nodulisporium</i> sp. (BAFCcult 4416) E	19,18	4,99
<i>P. chrysosporium</i> (BAFCcult 4415) E	21,64	4,44
<i>Control</i>	0,31	0,47

Tabla 19: Porcentajes de pérdida de peso seco. Promedio y desviación estándar (DE) para cada tratamiento. N= 20. E: aislado como endofito. P: aislado como patógeno.

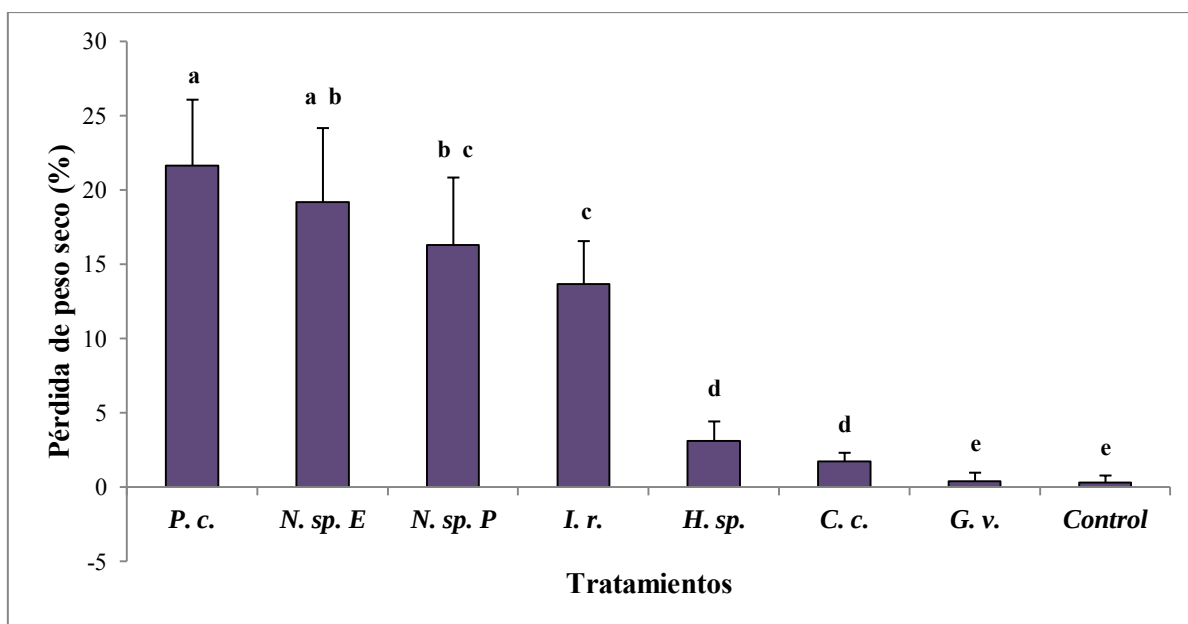


Figura 68: Porcentaje de pérdida de peso seco en probetas de *P. acerifolia*. **P. c.** = *Phanerochaete chrysosporium*; **N. sp. E** = *Nodulisporium* sp. endofítico BAFCcult 4416; **N. sp. P** = *Nodulisporium* sp. patógeno BAFCcult 4384; **I. r.** = *Inonotus rickii*; **H. sp.** = *Hymenochaete* sp.; **C. c.** = *Coprinopsis cinerea*; **G. v.** = *Granulobasidium vellereum*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según ANOVA de 1 factor y test de Tukey (HSD) ($p < 0,01$). $N = 20$ para todos los tratamientos.

Al analizar las medias por contrastes, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de degradación causados por las cepas endofítica y patogénica de *Nodulisporium* ($p = 0,23$) (Tabla 1').

Finalmente, al comparar la cepa endofítica de *Inonotus rickii* aislada de *P. acerifolia* en este trabajo, con la cepa patogénica de esta misma especie (Robles *et al.*, 2011) se observó las pérdidas de peso seco resultaron significativamente diferentes (ANOVA $F = 44,04$; $p < 0,0001$). La cepa de *I. rickii* aislada de plátanos sintomáticos (Robles *et al.*, 2011) produjo una pérdida de peso seco de $8,4 \pm 2,2$ % mientras que la pérdida de peso seco causada por la cepa endofítica fue de $13,7 \pm 2,9$ %.

6. Control biológico

6.1. Ensayos de confrontación en cultivos duales

En las Tablas 20-23 pueden observarse los resultados cualitativos de los cultivos duales entre especies xilófagas y antagonistas saprófitos y endofíticos y los porcentajes de inhibición de crecimiento de la colonia, luego de un mes de ensayo. En las Figuras 69-72 se detallan las curvas de crecimiento de los xilófagos durante los ensayos en presencia de los diferentes antagonistas.

Las colonias de las cepas endofítica y saprofítica de *T. harzianum* crecieron sobre las colonias de los xilófagos (sobrecrecimiento del antagonista) en casi todos los casos, tanto al ser inoculadas antes o después que los xilófagos. *Granulobasidium vellereum* mostró antagonismo contra *G. resinaceum*, *I. rickii* y contra *B. adusta* solamente al ser inoculado en primer lugar. *Inonotus rickii* fue el único xilófago afectado en alguna medida por todos los antagonistas evaluados.

En las Figuras 73-76 se muestra el aspecto de los cultivos duales (anverso y reverso) luego de 1 mes de cultivo y en la Figura 77 el aspecto de las colonias control de los antagonistas luego de 1 mes de ensayo.

Antagonista	<i>B. adusta</i>		<i>G. resinaceum</i>	
	1º antagonista	1º xilófago	1º antagonista	1º xilófago
<i>A. alternata</i> S	-	-	+ (1)	-
<i>A. alternata</i> E	-	-	+	-
<i>C. cladosporioides</i> S	-	-	-	-
<i>C. cladosporioides</i> E	-	-	-	-
<i>T. harzianum</i> S	++	++ / -	++	++
<i>T. harzianum</i> E	++	-	++	++
<i>C. cinerea</i> E	-	-	-	-
<i>G. vellereum</i> E	+	-	+	+
<i>T. sporotrichoides</i> E	-	-	-	-

Tabla 20: Resultados de enfrentamientos en cultivos duales entre antagonistas saprófitos y endofitos y basidiomicetes xilófagos (*B. adusta* y *G. resinaceum*), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo. S: aislado como saprófito. E: aislado como endofito. ++= sobrecrecimiento del antagonista sobre el xilófago; += el antagonista impide el normal crecimiento del xilófago, sin sobrecrecimiento; - = sobrecrecimiento del xilófago sobre el antagonista; (1)= xilófago crece sobre el antagonista, aunque más lento que el control; ++/- = en algunas réplicas se observa sobrecrecimiento del antagonista y en otras sobrecrecimiento del xilófago.

Antagonista	<i>I. rickii</i>		<i>T. trogii</i>	
	1° antagonista	1° xilófago	1° antagonista	1° xilófago
<i>A. alternata</i> S	++	+	-	-
<i>A. alternata</i> E	+ (1)	+	-	-
<i>C. cladosporioides</i> S	+	+	-	-
<i>C. cladosporioides</i> E	+	+	-	-
<i>T. harzianum</i> S	++	++	++	++
<i>T. harzianum</i> E	++	++	++	+/-
<i>C. cinerea</i> E	+	+	-	-
<i>G. vellereum</i> E	++	++	+/-	- (1)
<i>T. sporotrichoides</i> E	- (1)	- (1)	-	-

Tabla 21: Resultados de enfrentamientos en cultivos duales entre endófitos y basidiomicetes xilófagos (*I. rickii* y *T. trogii*), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo. S: aislado como saprófito. E: aislado como endófito. ++= sobrecrecimiento del antagonista sobre el xilófago; += el antagonista impide el normal crecimiento del xilófago, sin sobrecrecimiento; - = sobrecrecimiento del xilófago sobre el antagonista; (1)= xilófago crece sobre el antagonista, aunque más lento que el control; +/- = en algunas réplicas se observa sobrecrecimiento del antagonista y en otras sobrecrecimiento del xilófago.

Antagonista	<i>B. adusta</i>		<i>G. resinaceum</i>	
	1° antagonista	1° xilófago	1° antagonista	1° xilófago
<i>A. alternaria</i> S	0	0	45,75	3,25
<i>A. alternaria</i> E	0	0	41,50	0
<i>C. cladosporioides</i> S	0	0	0	0
<i>C. cladosporioides</i> E	0	0	21	0
<i>T. harzianum</i> S	100	26,25	100	55
<i>T. harzianum</i> E	100	0	100	46,62
<i>C. cinerea</i> E	0	0	5	0
<i>G. vellereum</i> E	65,75	0	77,25	26,56
<i>T. sporotrichoides</i> E	0	0	0	0

Tabla 22: Inhibición de crecimiento (%) en enfrentamientos en cultivos duales entre antagonistas saprófitos y endófitos y basidiomicetes xilófagos (*B. adusta* y *G. resinaceum*), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo. S: aislado como saprófito. E: aislado como endófito.

Antagonista	<i>I. rickii</i>		<i>T. trogii</i>	
	1° antagonista	1° xilófago	1° antagonista	1° xilófago
<i>A. alternaria</i> S	82	63	12,5	0
<i>A. alternaria</i> E	90,13	65,87	4,87	0
<i>C. cladosporioides</i> S	42,42	38,4	0	0
<i>C. cladosporioides</i> E	69,87	50,4	5,62	0
<i>T. harzianum</i> S	100	88,27	100	45,25
<i>T. harzianum</i> E	100	88,27	100	12,5
<i>C. cinerea</i> E	58,67	43	0	0
<i>G. vellereum</i> E	96,53	73,6	34	0
<i>T. sporotrichoides</i> E	44,53	23,73	0	0

Tabla 23: Inhibición de crecimiento (%) en enfrentamientos en cultivos duales entre antagonistas saprofitos y endofitos y basidiomicetes xilófagos (*I. rickii* y *T. trogii*), todos obtenidos a partir de madera de plátano, luego de 1 mes de cultivo. S: aislado como saprófito. E: aislado como endofito.

Al realizar observaciones al microscopio de los diferentes cultivos duales, no se observó una interacción clara entre los micelios enfrentados. La excepción fue la combinación entre *T. trogii* y *T. harzianum* endofítico cuando el xilófago fue inoculado en primer lugar. En este caso, la zona de interacción adoptó una coloración anaranjada, observándose al microscopio hifas modificadas del basidiomicete, con paredes irregulares, coloración más oscura y la presencia de estructuras globosas que parecieran contener compuestos aceitosos (Fig. 78).

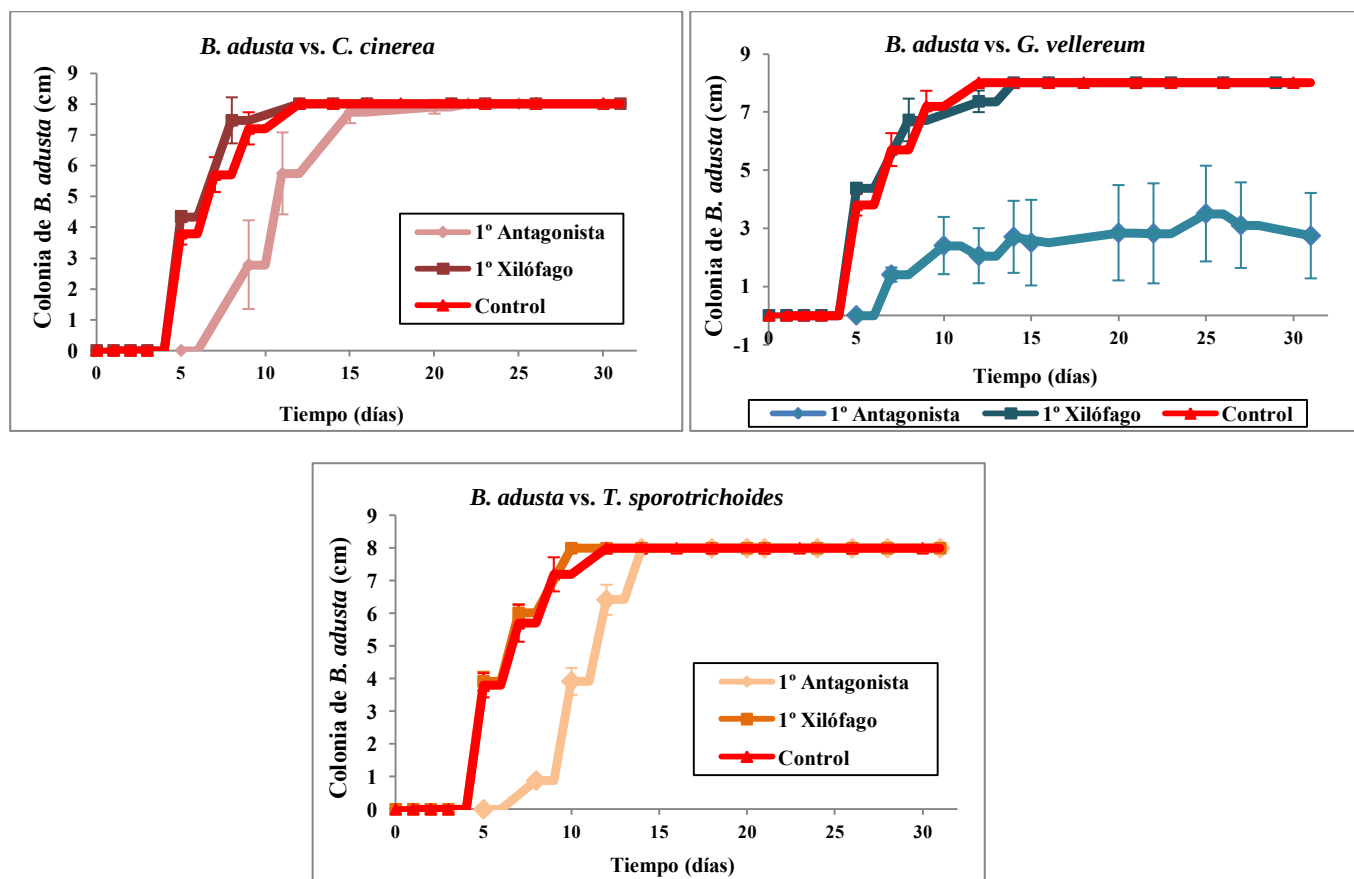
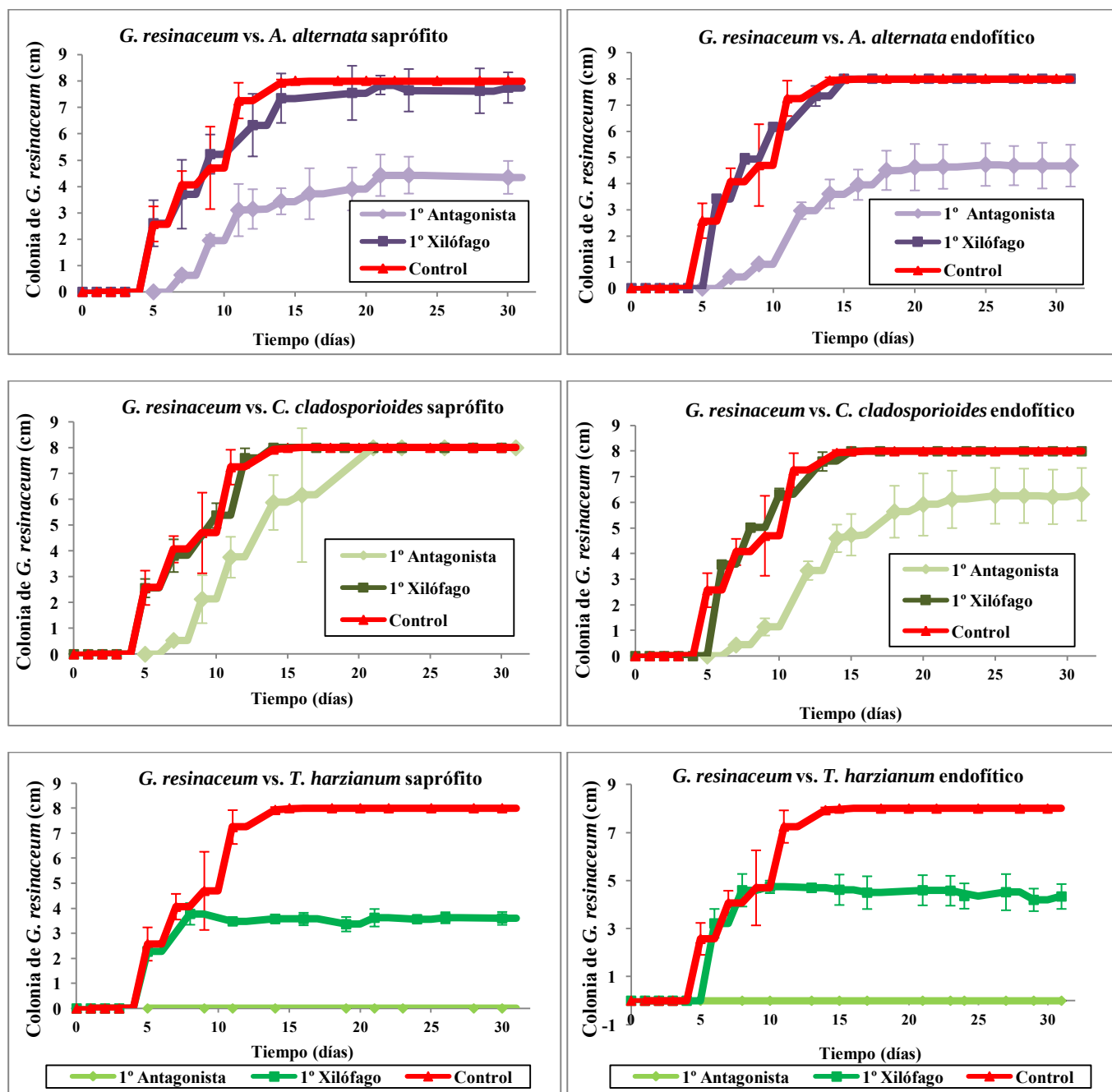


Figura 70: Aumento del radio de la colonia (cm) de *Ganoderma resinaceum* en presencia de los antagonistas evaluados.



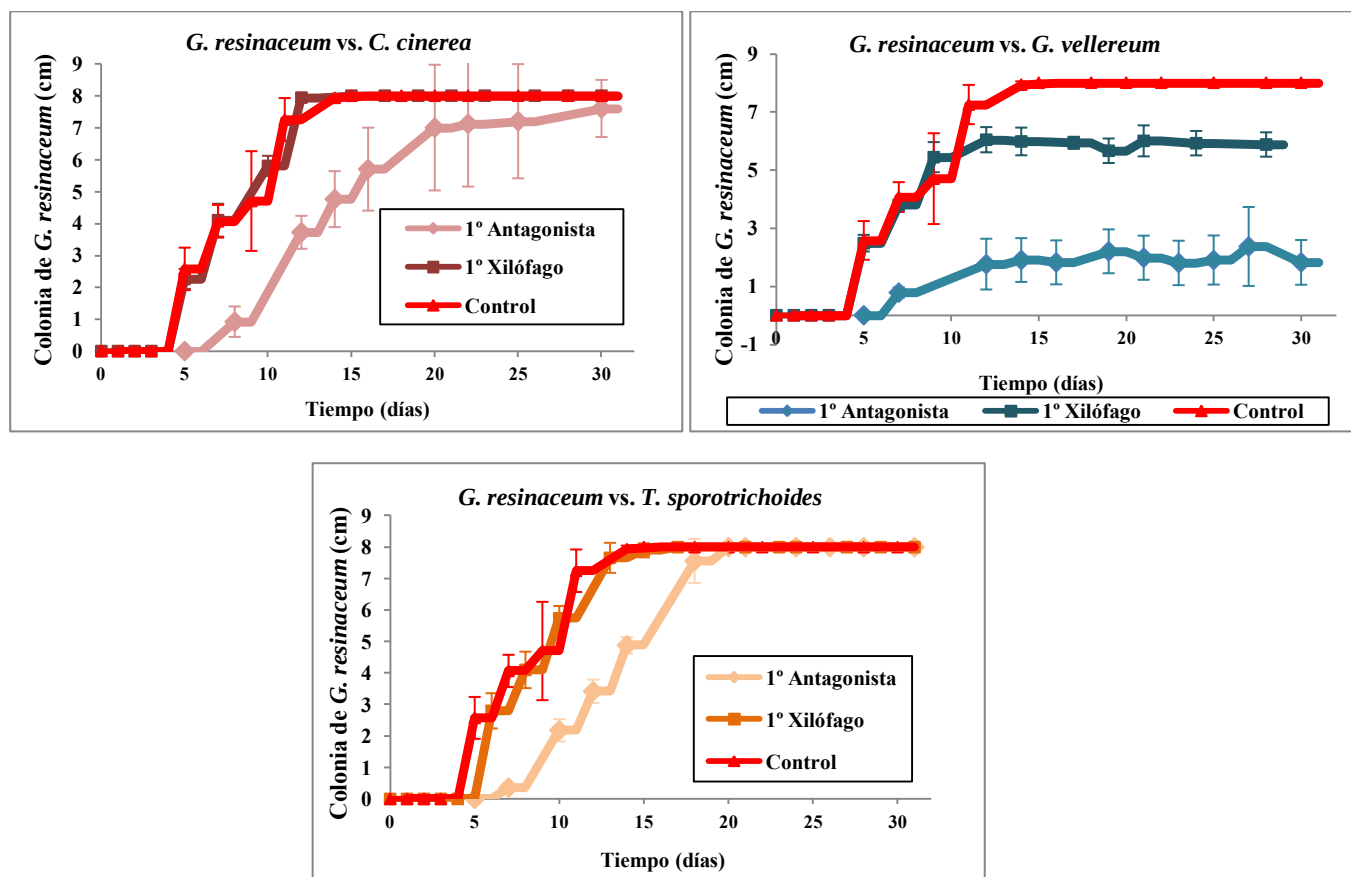
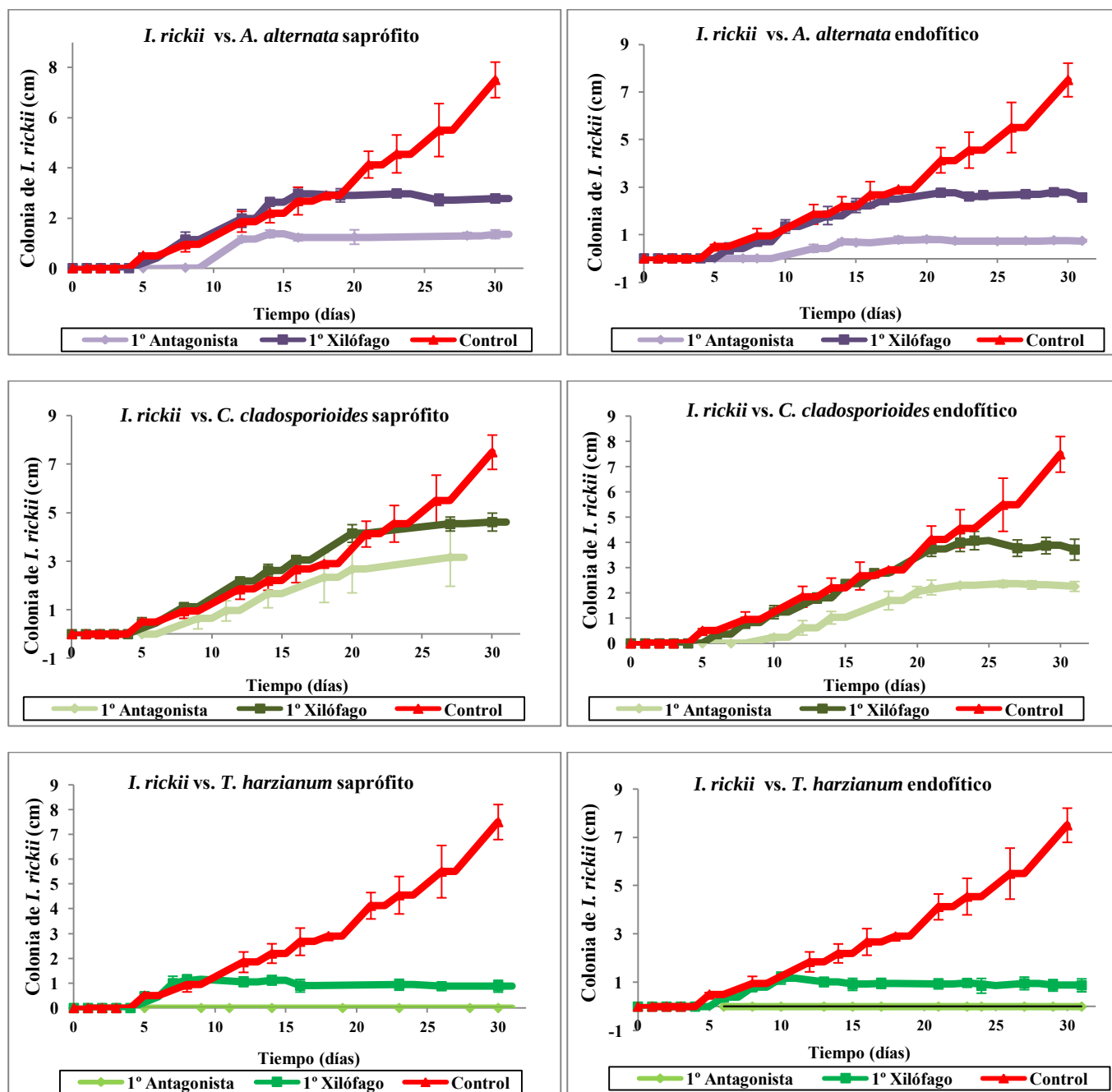


Figura 71: Aumento del radio de la colonia (cm) de *Inonotus rickii* en presencia de los antagonistas evaluados.



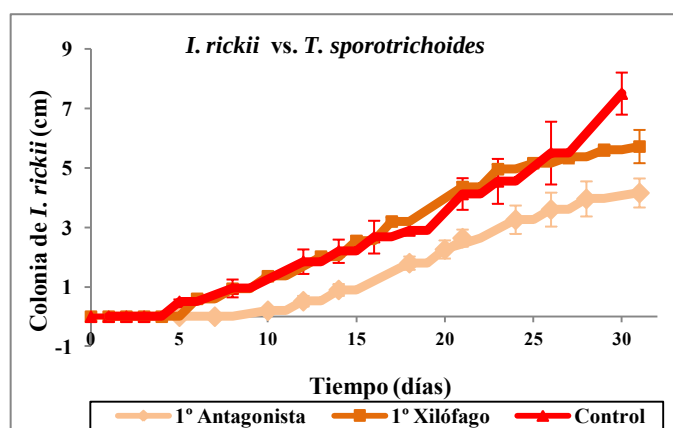
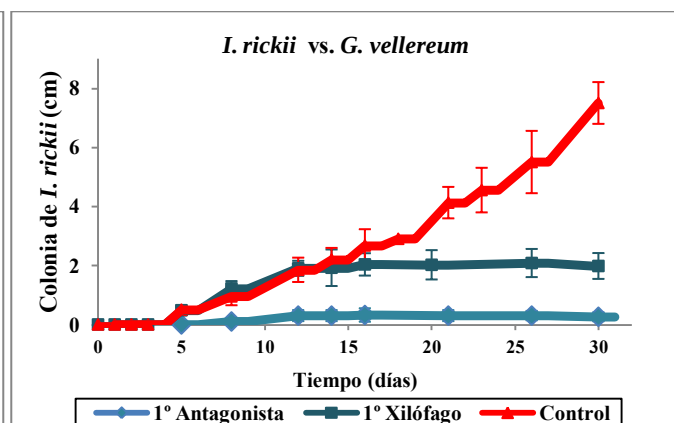
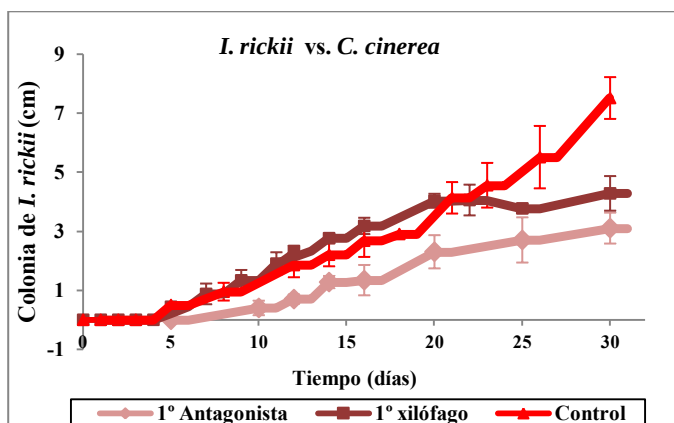
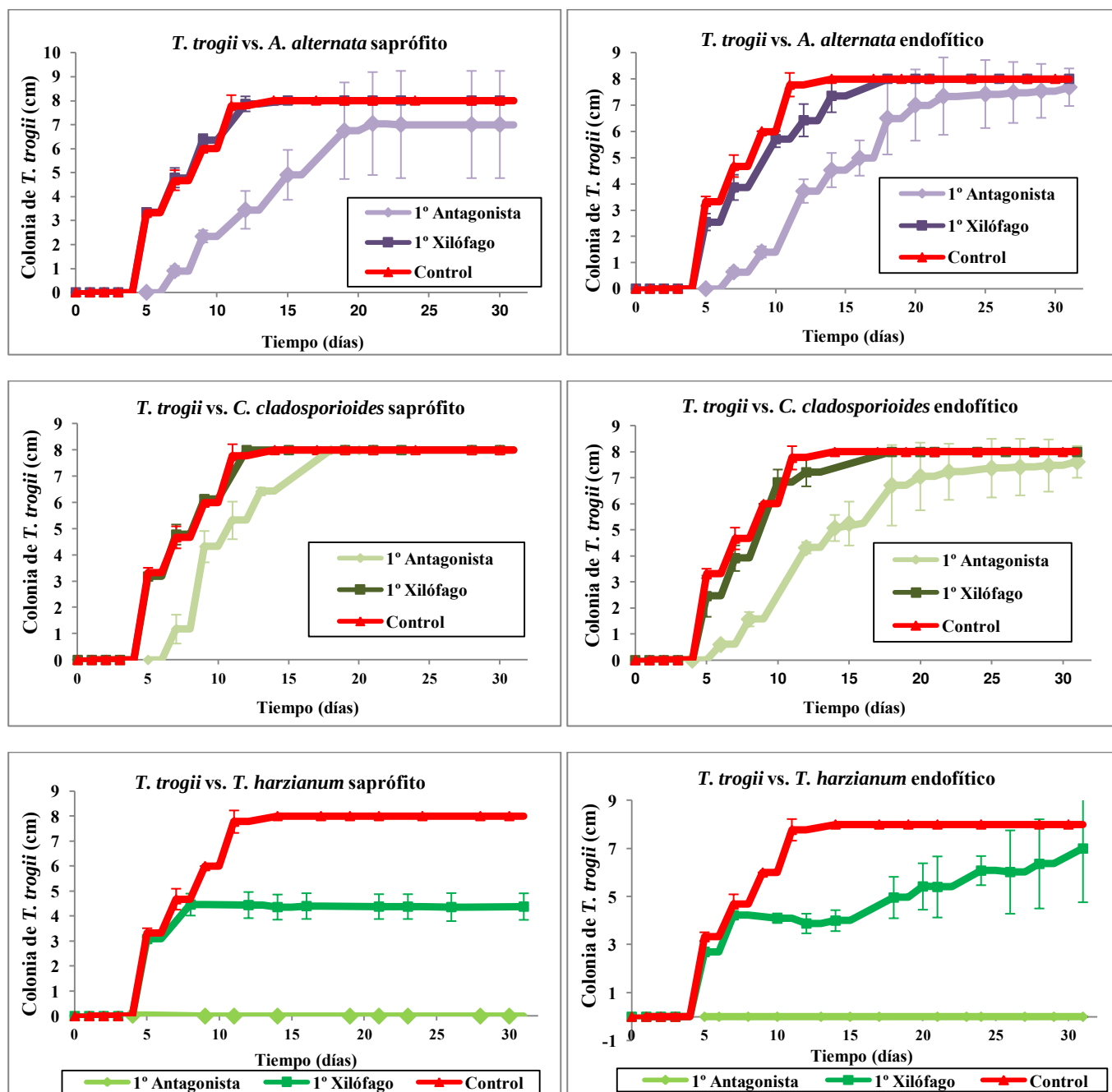


Figura 72: Aumento del radio de la colonia (cm) de *Trametes trogii* en presencia de los antagonistas evaluados.



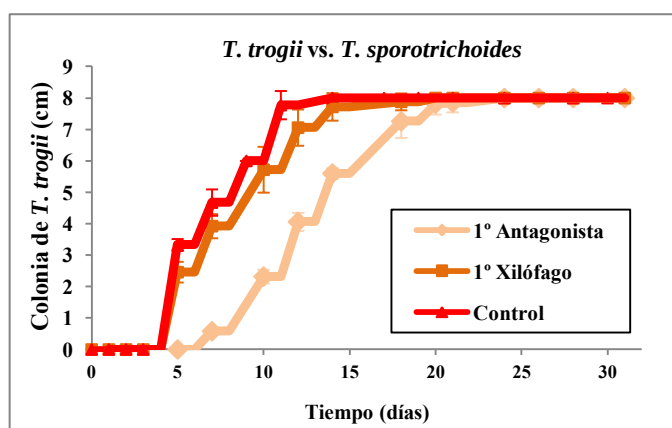
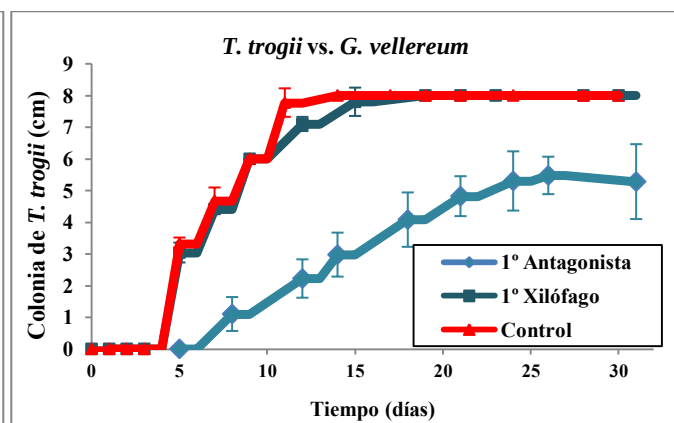
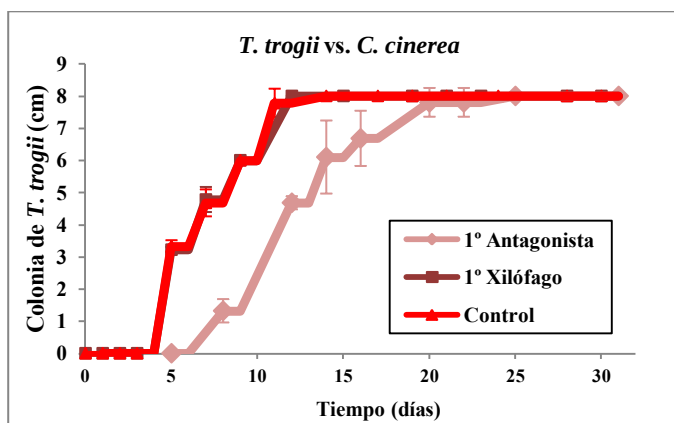


Figura 73: Cultivos duales entre el xilófago *B. adusta* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

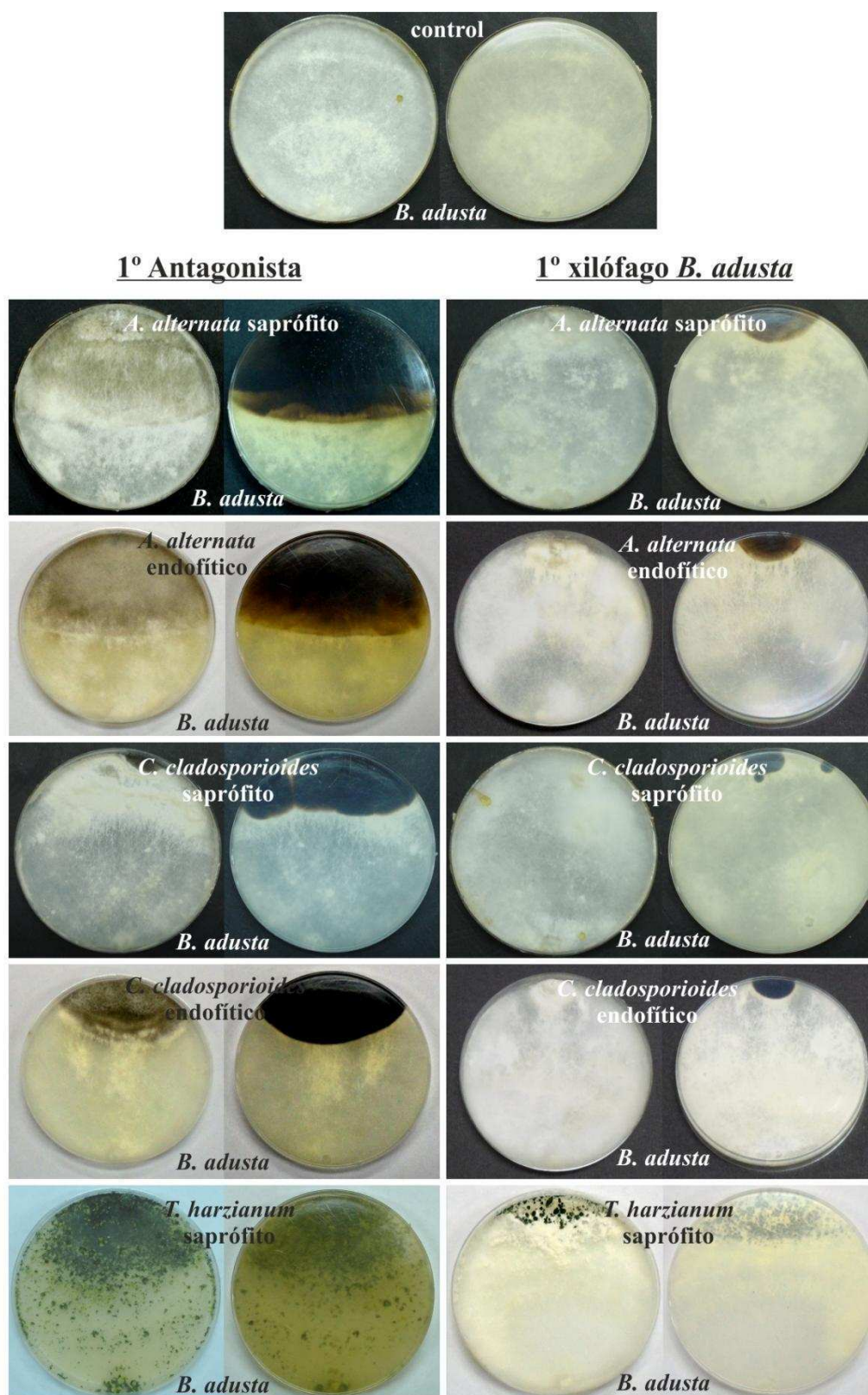


Figura 73 continuación: Cultivos duales entre el xilófago *B. adusta* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

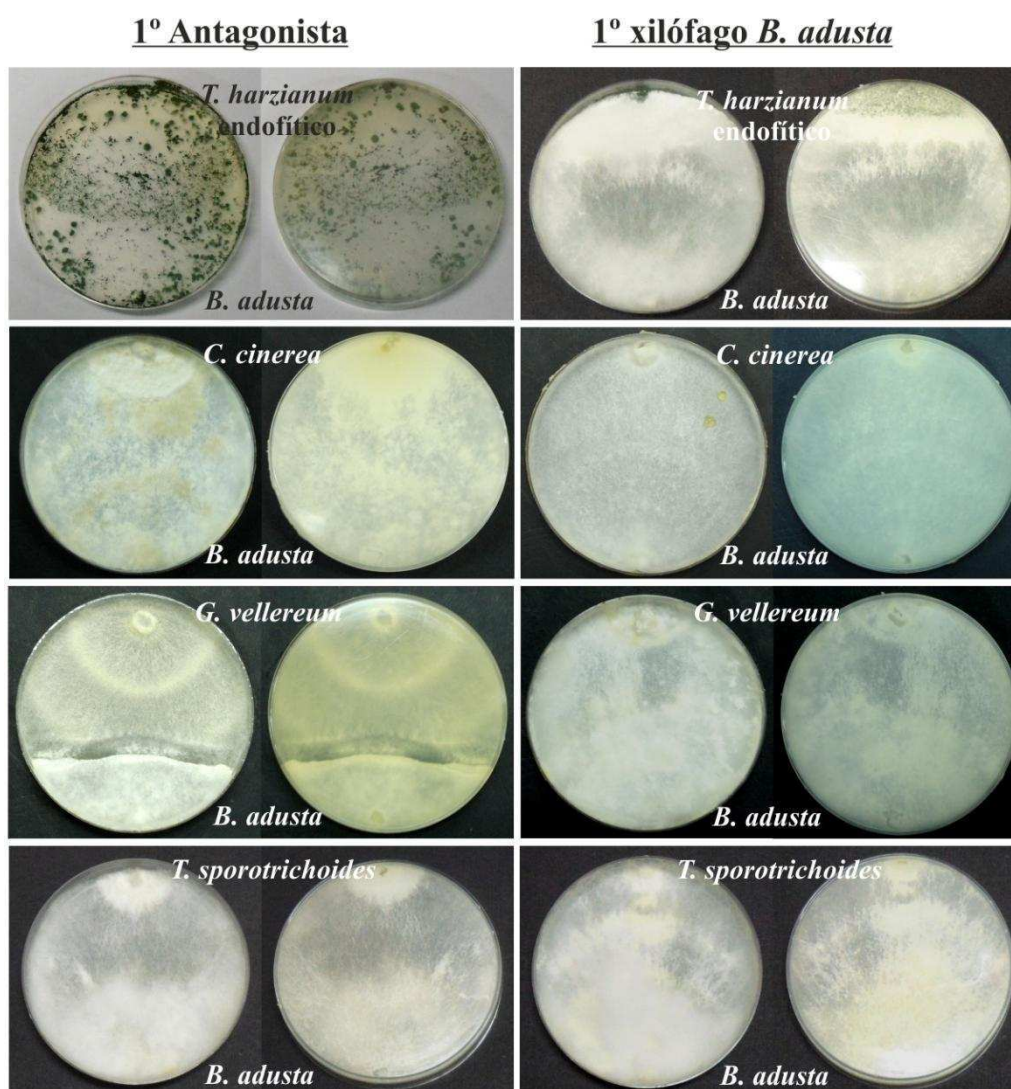


Figura 74: Cultivos duales entre el xilófago *G. resinaceum* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

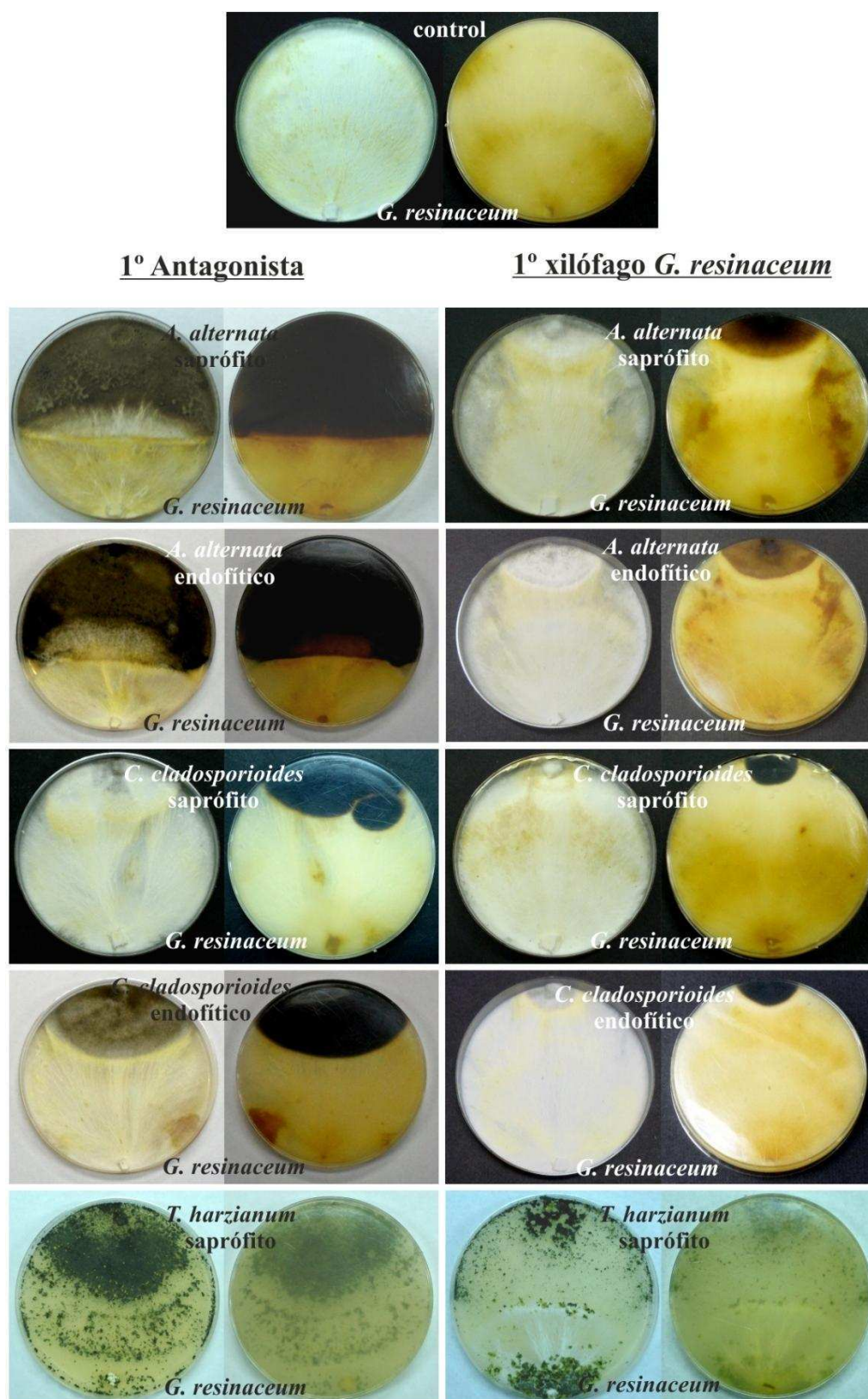


Figura 74 continuación: Cultivos duales entre el xilófago *G. resinaceum* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

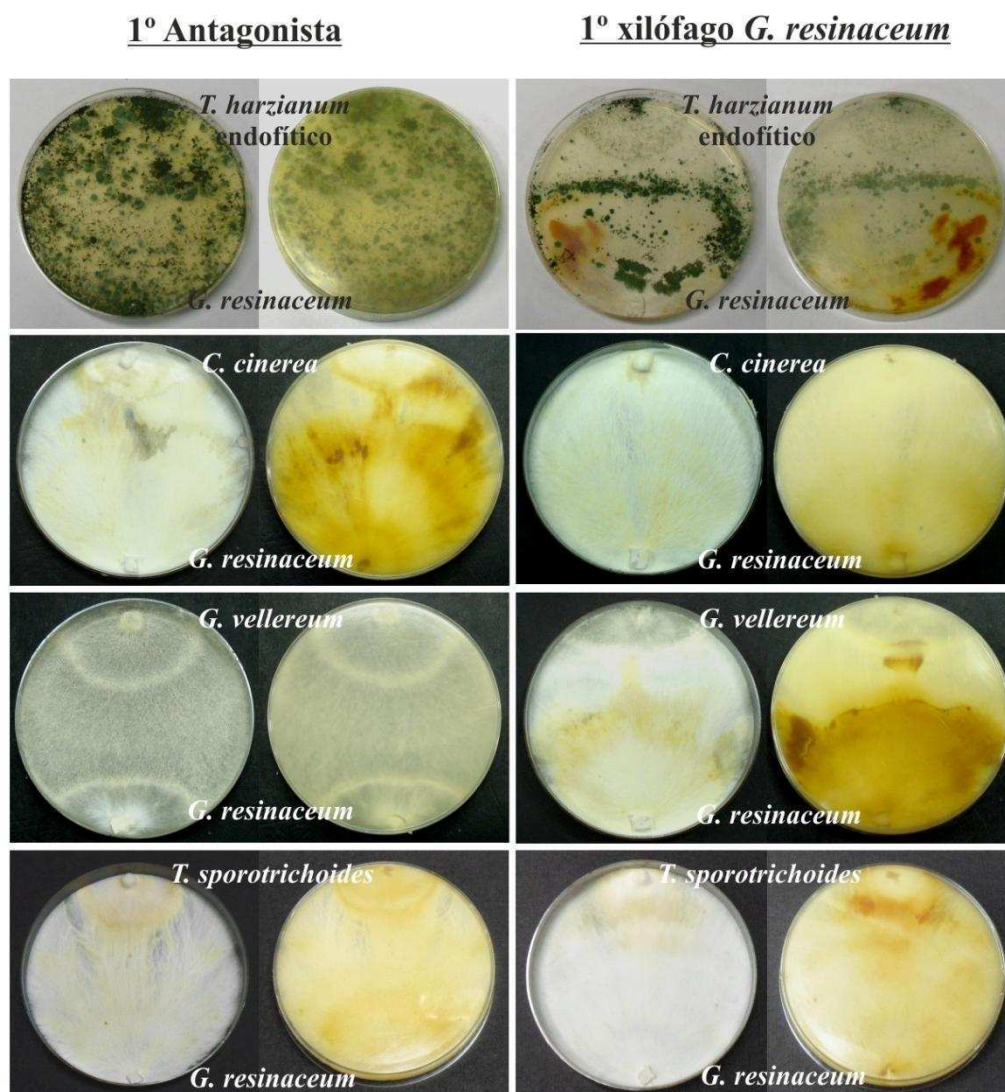


Figura 75: Cultivos duales entre el xilófago *I. rickii* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

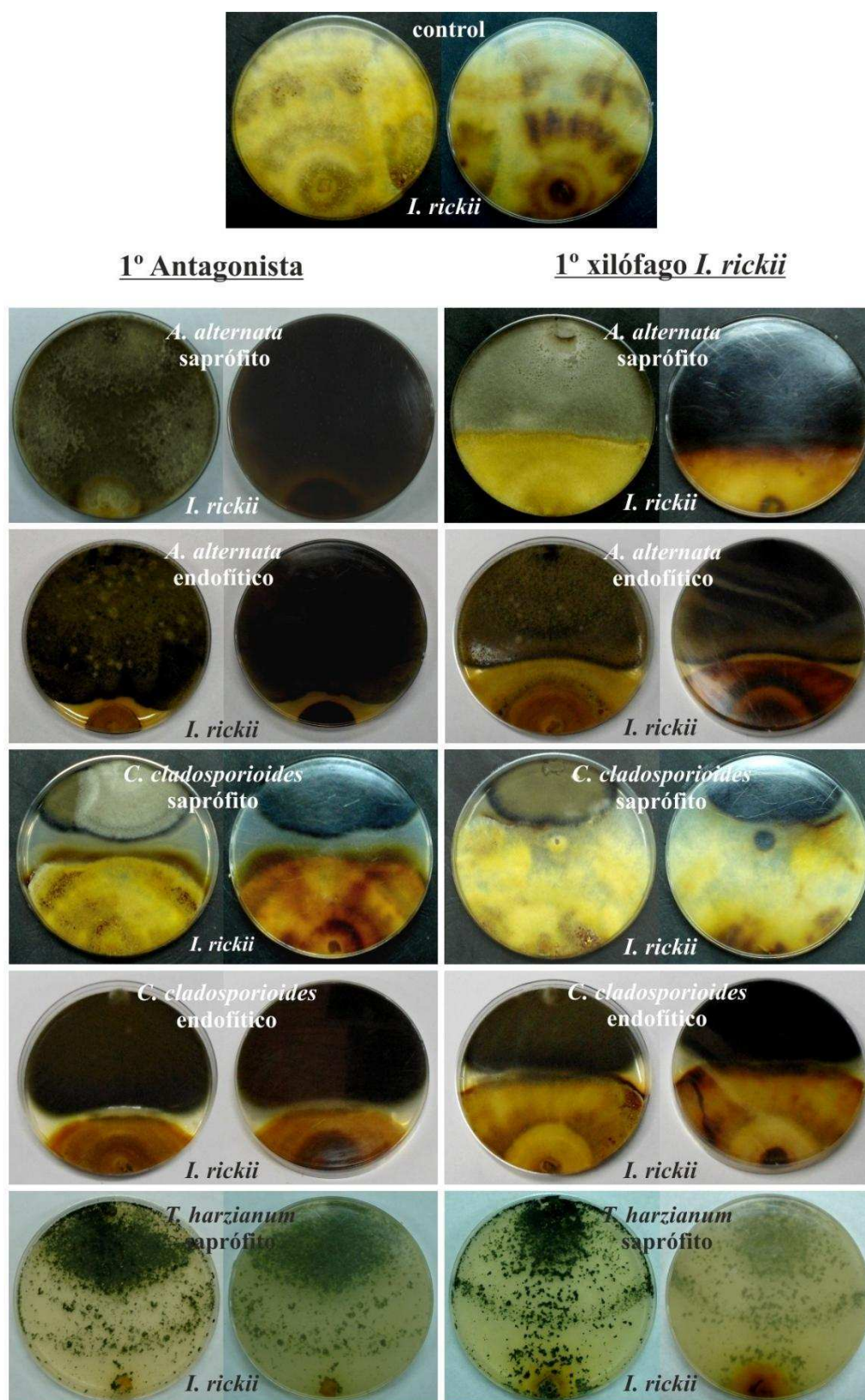


Figura 75 continuación: Cultivos duales entre el xilófago *I. rickii* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

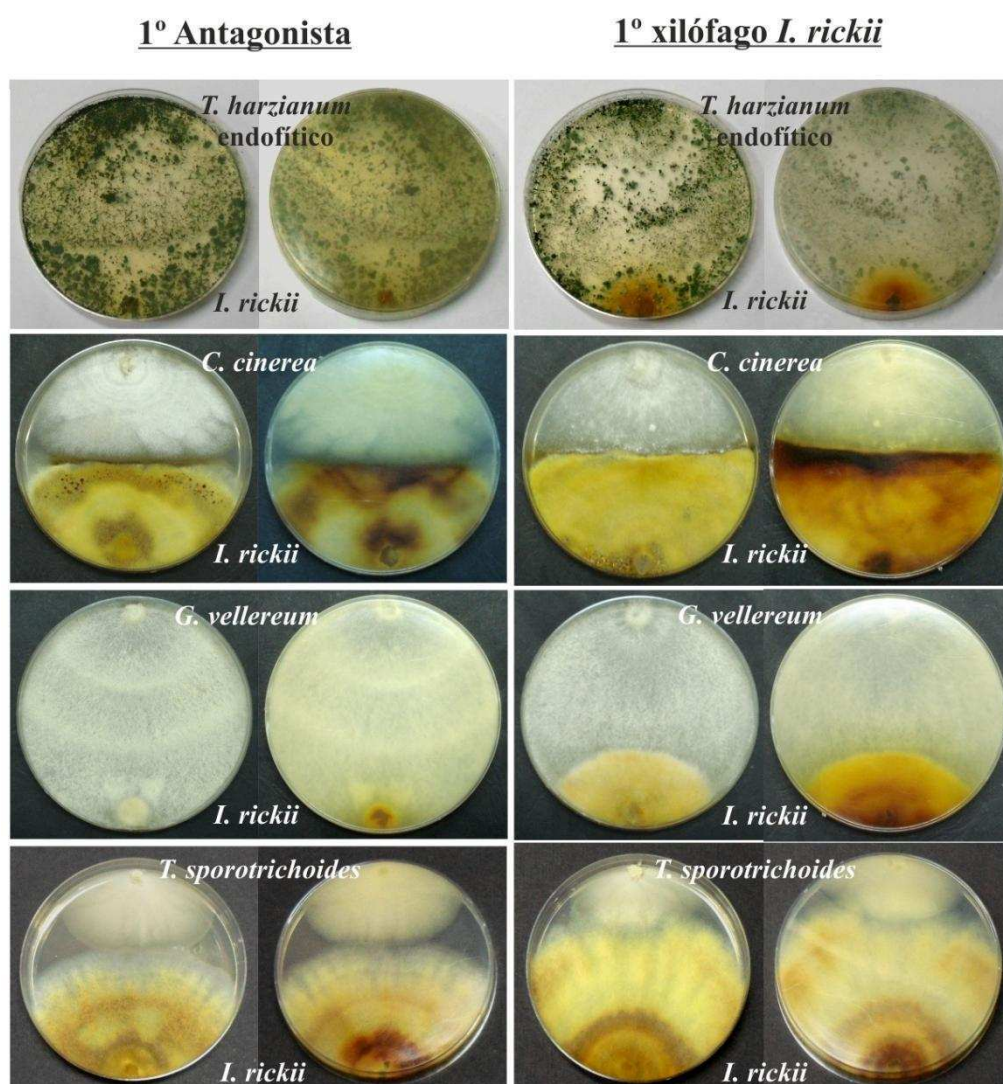


Figura 76: Cultivos duales entre el xilófago *T. trogii* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

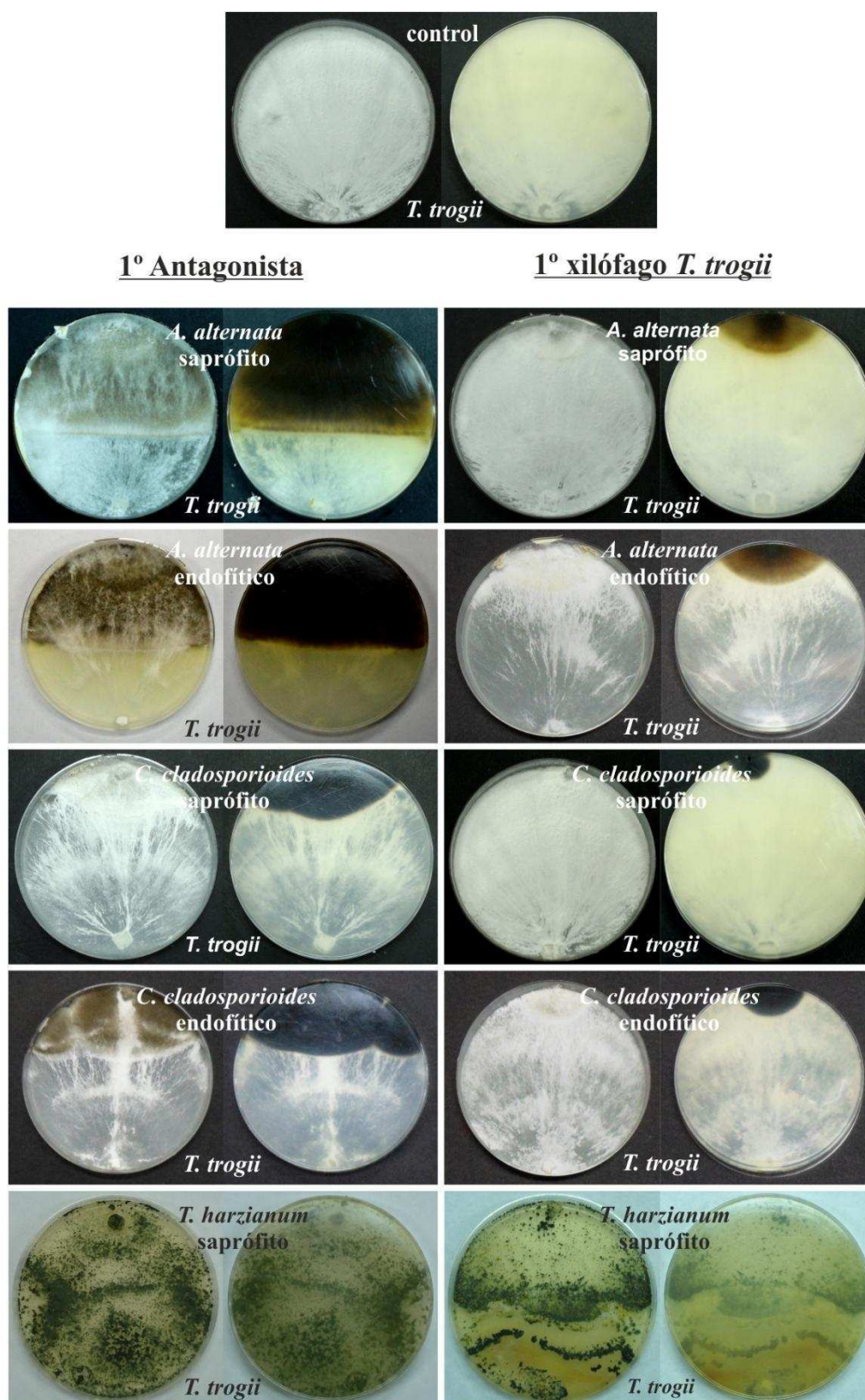


Figura 76 continuación: Cultivos duales entre el xilófago *T. trogii* y antagonistas saprófitos y endofíticos, luego de 1 mes.

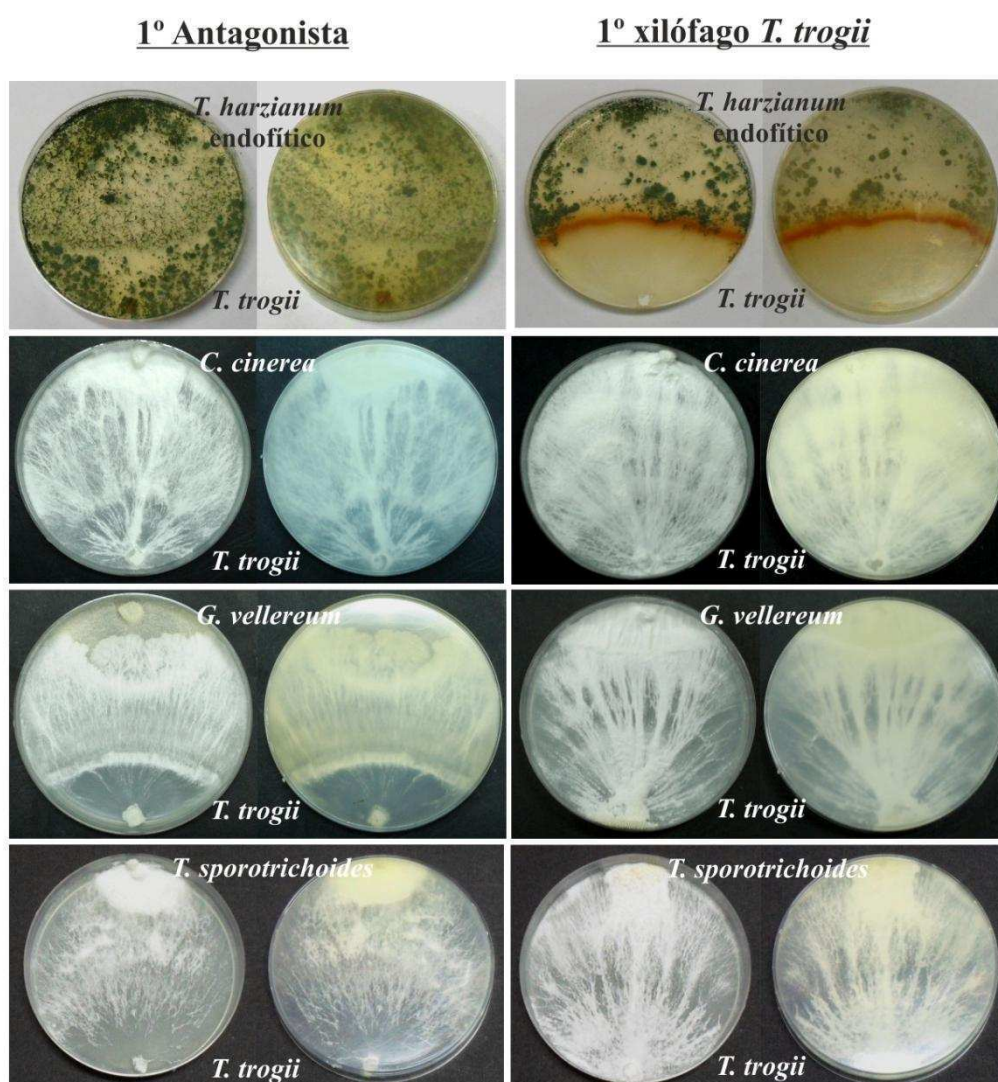


Figura 77: Cultivos controles de los antagonistas evaluados luego de 1 mes.

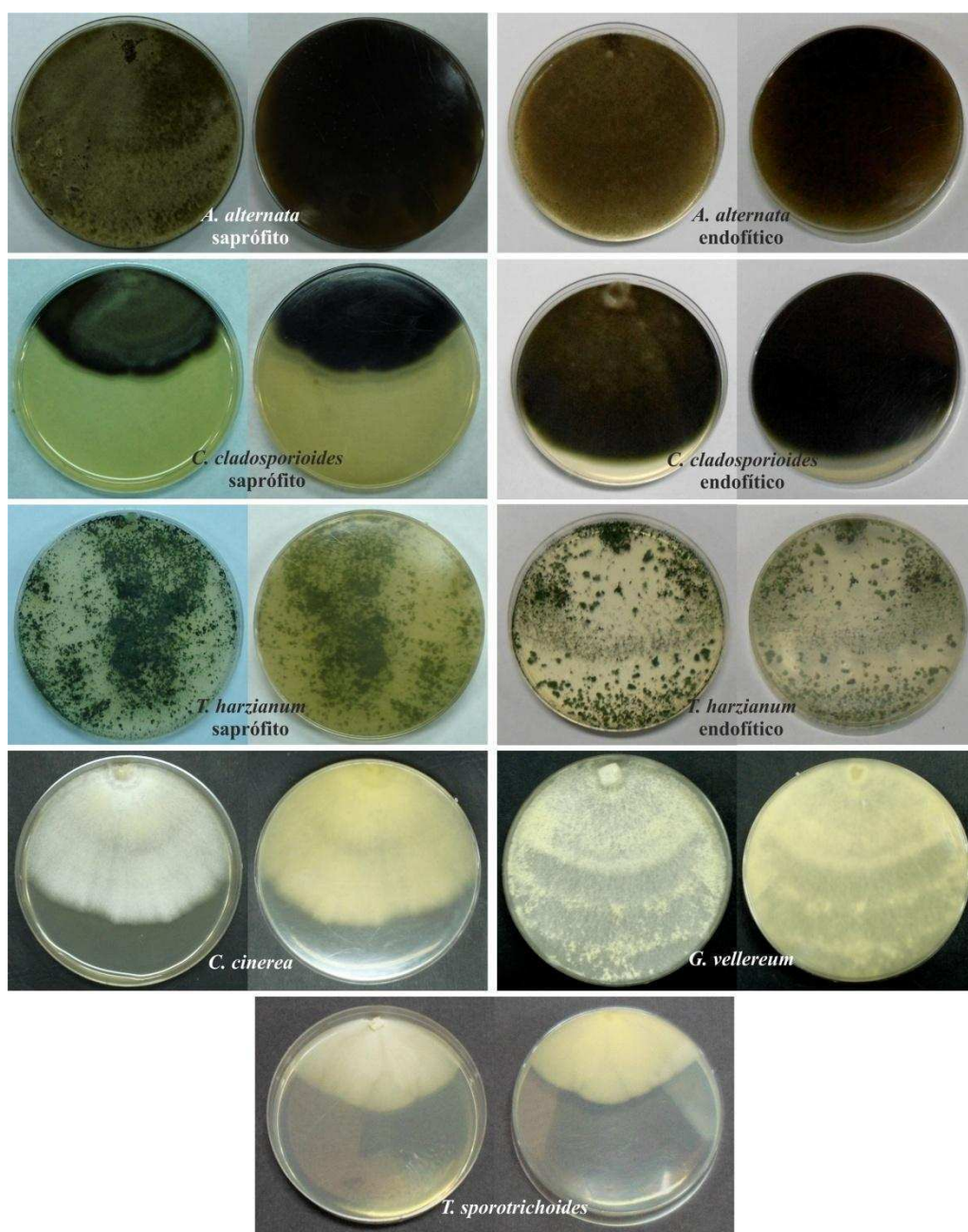




Figura 78: Interacción entre los micelios de *Trametes trogii* y *Trichoderma harzianum* endofítico en cultivos duales luego de 1 mes de incubación, al inocularse el xilófago en primer lugar. Escala: 20 μ m.

6.2. Ensayos de confrontación *in vitro* sobre probetas de madera de plátano entre *Granulobasidium vellereum* y hongos xilófagos

Los ensayos de confrontación *in vitro* entre especies xilófagas y el basidiomicete endofítico *Granulobasidium vellereum* se realizaron para evaluar más profundamente la capacidad antagonista de *G. vellereum*. Los resultados de estos ensayos, al cabo de 3 meses, son detallados en la Tabla 24. En las Figuras 79 y 80 se muestra la variación en la pérdida de peso seco entre los tratamientos con y sin antagonista. En la Figura 81 se ilustra el aspecto de los tratamientos al momento de la finalización del ensayo.

El análisis de los datos por ANOVA de 2 factores resultó significativo ($p < 0,01$) para los dos factores considerados (Tabla 25), sugiriendo que existen diferencias en cuanto al grado de degradación de la madera en ausencia y en presencia del antagonista inoculado antes y después que el xilófago, además se obtuvieron diferencias entre las distintas especies de xilófagos. A fines de una mejor organización se explica por separado el efecto de los tratamientos en los cuales se inoculó primero el antagonista y aquellos en los cuales se inoculó primero el xilófago.

Tratamiento	Promedio (%)	DE (%)
<i>Control</i>	0,31	0,47
<i>B. adusta</i> *	23,64	6,61
<i>G. resinaceum</i> *	13,58	2,61
<i>I. rickii</i> *	8,45	2,14
<i>T. trogii</i> *	17,67	4,63
<i>G. vellereum</i>	0,41	0,56
<i>G. v. + B. a.</i>	2,40	0,87
<i>G. v. + G. r.</i>	2,05	0,97
<i>G. v. + I. r.</i>	1,94	1,19
<i>G. v. + T. t.</i>	3,31	3,73
<i>B. a. + G. v.</i>	23,50	5,12
<i>G. r. + G. v.</i>	10,83	3,09
<i>I. r. + G. v.</i>	1,78	1,90
<i>T. t. + G. v.</i>	20,68	4,34

Tabla 24: Porcentajes de pérdida de peso seco a partir de los ensayos de confrontación *in vitro*. Promedio y desviación estándar (DE) para cada tratamiento. N= 17. *G. v. + ___*: antagonista inoculado en primer lugar. *___ + G. v.*: xilófago inoculado en primer lugar. *B. a.*: *Bjerkandera adusta*; *G. r.*: *Ganoderma resinaceum*; *G.v.*: *Granulobasidium vellereum*; *I. r.*: *Inonotus rickii*; *T. t.*: *Trametes trogii*. Los valores de pérdida de peso seco de las especies marcadas con asterisco (*) pertenecen a un estudio previo (Robles 2008; Robles *et al.* 2011).

6.2.1. Probetas inoculadas previamente con el antagonista

El análisis de los datos por ANOVA de 2 factores resultó significativo ($p < 0,01$) para los dos factores considerados, sugiriendo que existen diferencias en cuanto al grado de degradación de la madera en presencia y en ausencia del antagonista y que existen diferencias entre las distintas especies de xilófagos (Tabla 2' y 4', anexo). Como la interacción entre ambos factores también resultó significativa ($p < 0,01$), se realizó un análisis de efectos simples para determinar qué nivel o niveles de cada factor son los causantes de las diferencias observadas. Se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre la pérdida de peso seco producido por los distintos xilófagos tanto en presencia del antagonista como en ausencia del mismo, y que para cada patosistema existen diferencias significativas entre el porcentaje de peso seco perdido en presencia y ausencia de *Granulobasidium vellereum* ($p < 0,01$) (Tabla 5'-8', anexo).

6.2.2. Probetas inoculadas previamente con los xilófagos

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el tratamientos con y sin el antagonista y entre los efectos de los xilófagos. Como la interacción entre los factores también resulto significativa ($p < 0,01$), se realizó un análisis de efectos simples para determinar qué nivel o niveles de cada factor causaban las diferencias observadas. Los resultados indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el porcentaje de pérdida de peso seco producido por los diferentes xilófagos en presencia y ausencia del antagonista. El patosistema con *Inonotus rickii* mostró diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el porcentaje de madera degradada en presencia y ausencia de *Granulobasidium vellereum*. En cambio, las probetas inoculadas con *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma resinaceum* y *Trametes trogii* con el antagonista presentaron un porcentaje de pérdida de peso similar al producido por los xilófagos solos ($p > 0,01$) (Tabla 9'-12', anexo). En el caso de *Trametes trogii*, las probetas con presencia del antagonista presentaron una pérdida de peso levemente mayor que las tratados solamente con el xilófago.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	<i>p</i>
Xilófago	4	405,04	101,26	407,83	< 0,0001
Antagonista	2	186,20	93,10	374,96	< 0,0001
Interacción	8	116,64	14,58	58,72	< 0,0001
Error	257	63,81	0,25		
Total	271				

Tabla 25: Análisis de la varianza de dos factores para el porcentaje de peso seco perdido.

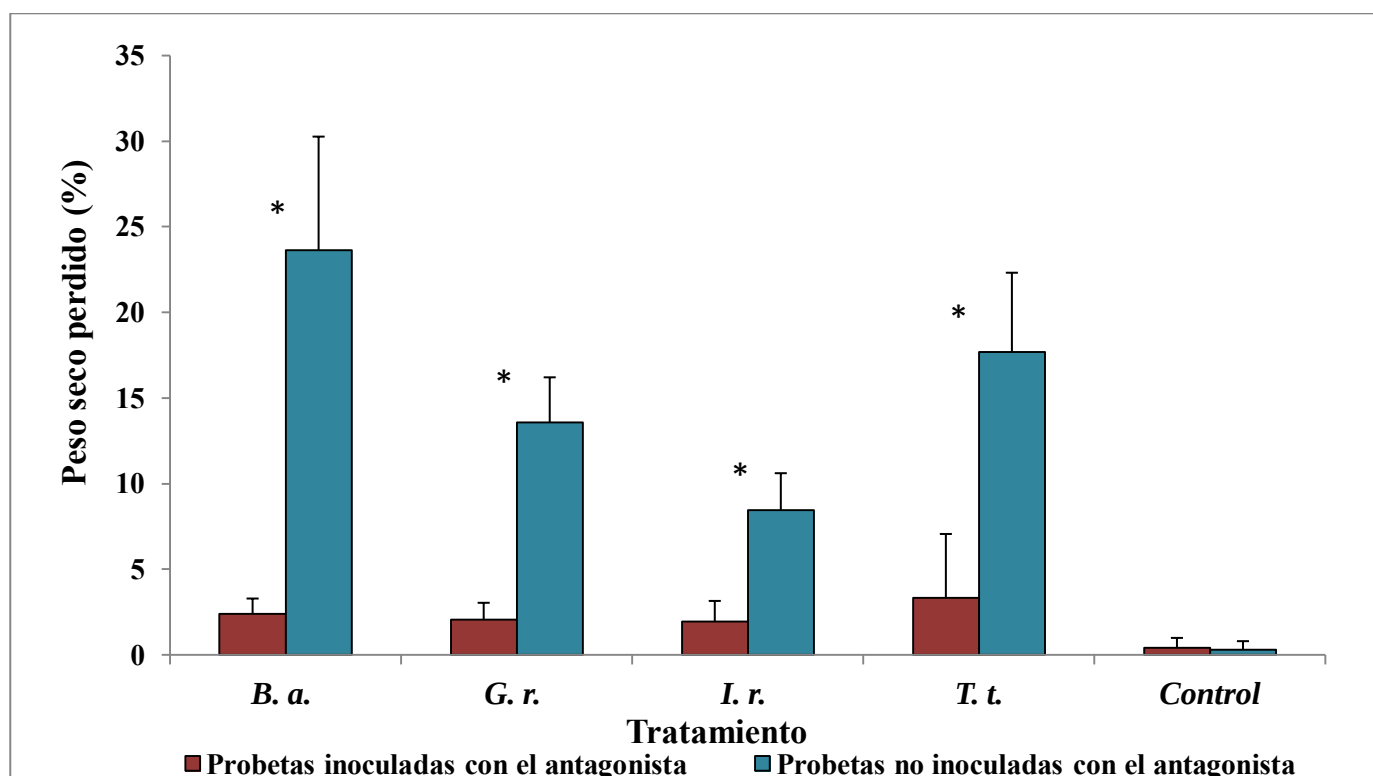


Figura 79: Variación el porcentaje de pérdida de peso seco de madera de plátano cuando el antagonista fue inoculado antes que el xilófago. *B. a.*: *Bjerkandera adusta*; *G. r.*: *Ganoderma resinaceum*; *I. r.*: *Inonotus rickii*; *T. t.*: *Trametes trogii*. Los valores de *B. a.*; *G. r.*; *I. r.* y *T. t.* sin antagonista pertenecen a resultados presentados por Robles (2008) y Robles *et al.* (2011). N= 17-19. * indica diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el tratamiento con y sin el antagonista según la prueba de efectos simples.

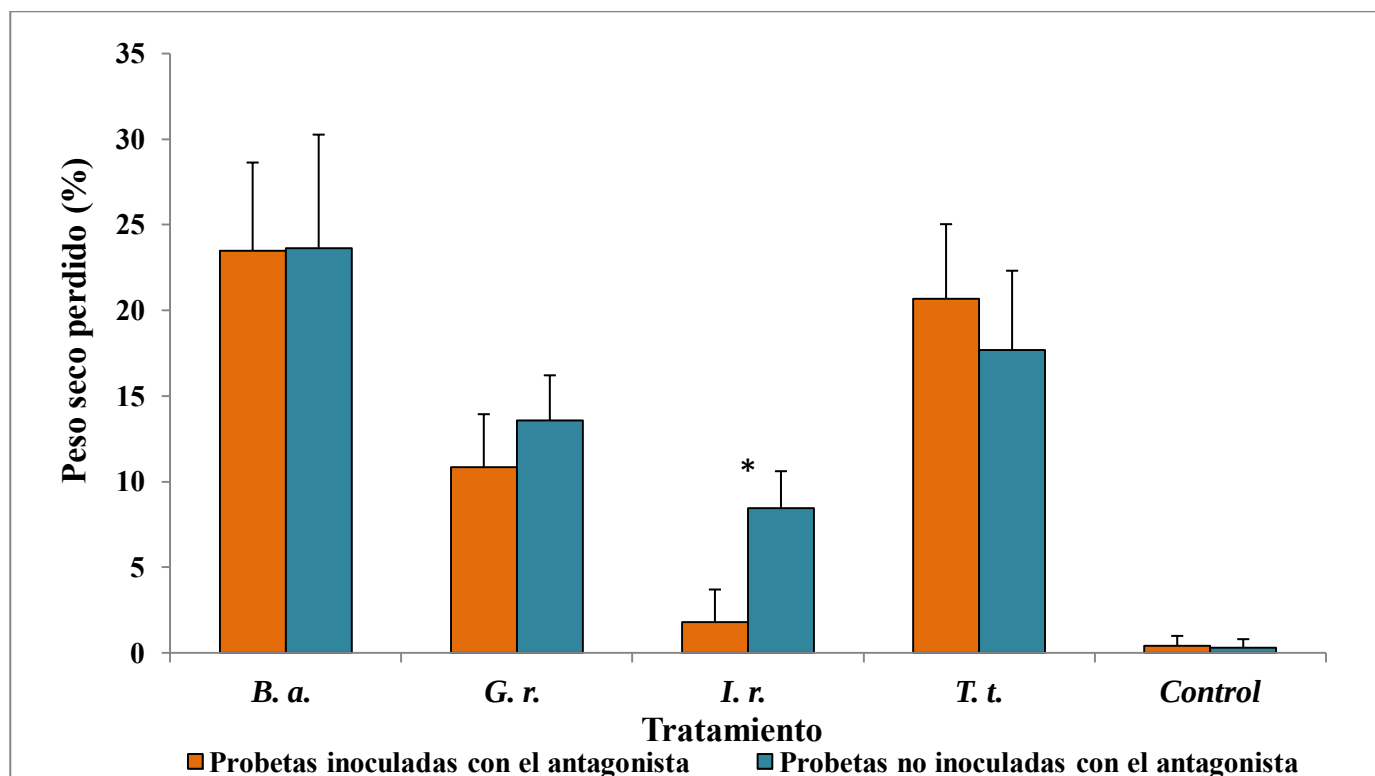


Figura 80: Variación el porcentaje de pérdida de peso seco de madera de plátano cuando el xilófago fue inoculado antes que el antagonista. *B. a.*: *Bjerkandera adusta*; *G. r.*: *Ganoderma resinaceum*; *I. r.*: *Inonotus rickii*; *T. t.*: *Trametes trogii*. Los valores de *B. a.*; *G. r.*; *I. r.* y *T. t.* sin antagonista pertenecen a resultados presentados por Robles (2008) y Robles *et al.* (2011). N= 17-19. * indica diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el tratamiento con y sin el antagonista según la prueba de efectos simples.

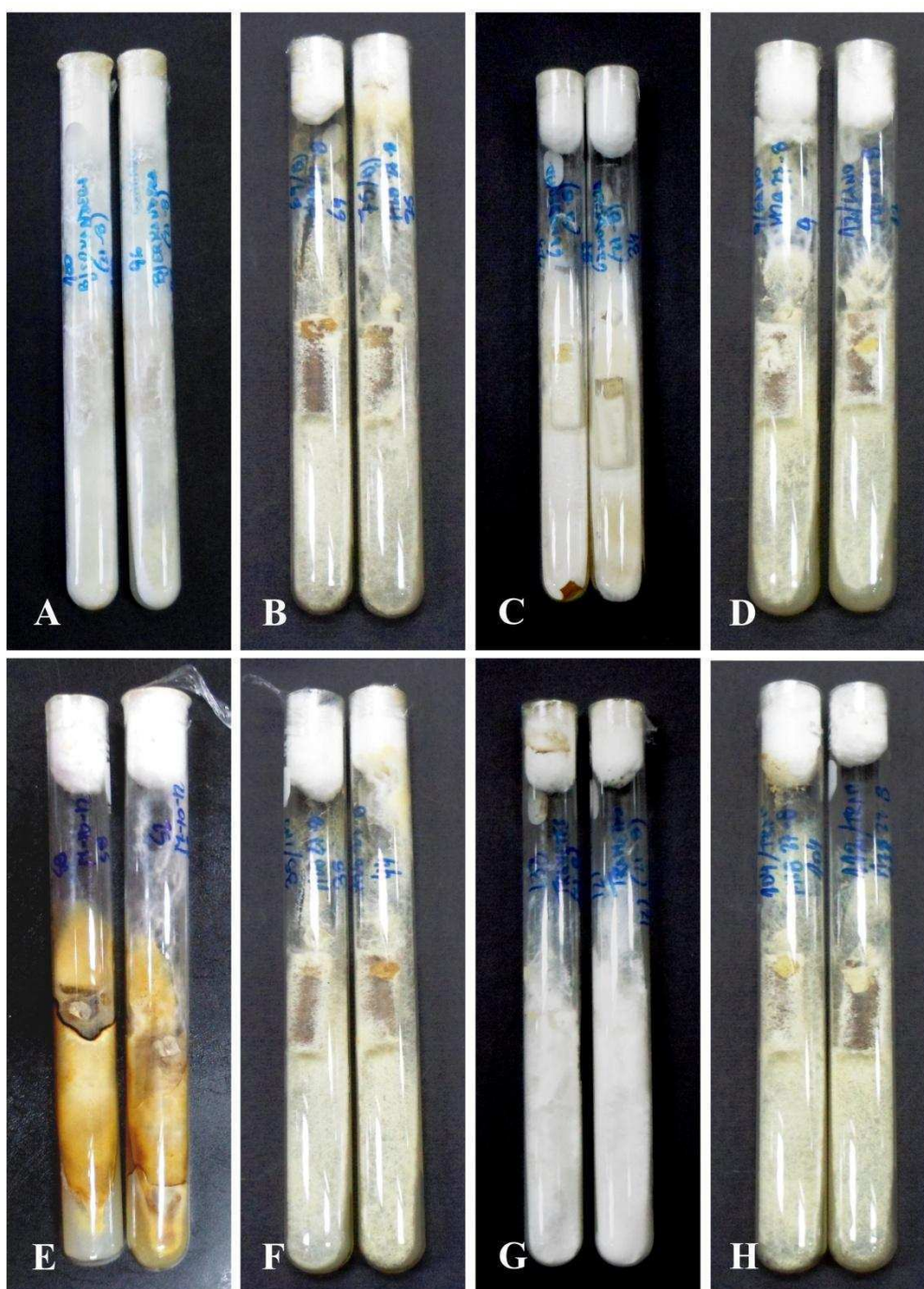


Figura 81: Aspecto de los tubos al finalizar el ensayo de confrontación *in vitro*. (A) *B. adusta* + *G. vellereum*. (B) *G. vellereum* + *B. adusta*. (C) *G. resinaceum* + *G. vellereum*. (D) *G. vellereum* + *G. resinaceum*. (E) *I. rickii* + *G. vellereum*. (F) *G. vellereum* + *I. rickii*. (G) *T. trogii* + *G. vellereum*. (H) *G. vellereum* + *T. trogii*.

7. Estudios histológicos

Se trabajó con las probetas afectadas por *B. adusta* e *I. rickii* debido a la gran importancia de estos hongos xilófagos en el arbolado urbano de la Ciudad de Buenos Aires, ya indicada en Robles *et al.* (2011).

Los resultados cualitativos de las tinciones por safranina-Fast green y Rojo de rutenio, como la autofluorescencia de lignina y las propiedades anisotrópicas de la celulosa, se enumeran en la Tabla 26 y se ilustran en las Figuras 82-86. Las observaciones bajo luz polarizada mostraron que *B. adusta* produjo una reducción de la birrefringencia con respecto a la madera control. Esto no fue observado en la madera afectada por *I. rickii*. En ambos tratamientos con los xilófagos se observó una reducción de la autofluorescencia de lignina.

	Control	<i>B. adusta</i>	<i>I. rickii</i>
Safranina Fast-Green	Paredes celulares teñidas intensamente.	No diferencias apreciables en tinción con respecto al control. Adelgazamiento y degradación de las paredes celulares de fibras.	Reducción de tinción de laminilla media. Separación de células.
Fluoroglucinol/HCl	Paredes celulares teñidas intensamente.	Degradación de las paredes tangenciales en la zona de transición del anillo.	Separación de células causada por degradación de laminilla media.
Rojo de rutenio	Laminilla media teñida intensamente.	No diferencias apreciables con la madera control.	Perdida de tinción de la laminilla media. Separación de células.
UV-autofluorescencia de lignina	Alta autofluorescencia de lignina, especialmente en las esquinas de las paredes celulares.	Perdida de autofluorescencia de lignina en las paredes tangenciales de las fibras en la zona de transición del anillo.	Reducción de autofluorescencia de lignina en las fibras y la laminilla media del parénquima termina, principalmente en la zona de transición del anillo.
Luz polarizada	Microfibrillas de celulosa visibles.	Sin diferencias apreciables con la madera control.	Sin diferencias apreciables con la madera control.

Tabla 26: Resultados de los histotests en madera control y madera afectada por *B. adusta* e *I. rickii*.

7.1. Microscopía óptica

En las Figuras 87 y 88 se observa la presencia y colonización de *B. adusta* e *I. rickii*, respectivamente, en la madera de plátano.

Al observar los cortes transversales ultrafinos de la madera control, los elementos de vaso aparecieron solitarios o agrupados, con un contorno poligonal a redondeado y paredes gruesas. El parénquima axial se observó escaso y difuso mientras que las células del parénquima radial se vieron rectangulares y elongadas radialmente. Todas las células parenquimáticas exhibieron citoplasma, vacuolas y paredes secundarias gruesas. Las fibras fueron abundantes, poligonales, con lumen evidente y paredes muy gruesas. En general, con azul de toluidina, la laminilla media se tiñó de azul oscuro y las paredes secundarias de azul púrpura (Fig. 89A).

La madera afectada por *B. adusta*, en corte transversal ultrafino, exhibió un ataque fúngico de intensidad heterogénea, evidente bajo el microscopio óptico (Fig. 89B). Esta especie fúngica afectó principalmente las paredes secundarias del parénquima axial y las fibras. En la zona de transición entre anillos de crecimiento, las paredes tangenciales de fibras y parénquima terminal, aparecieron rotas, o menos frecuentemente, con diferentes grados de degradación (Fig. 89B-D). Las membranas de las puntuaciones se encontraron generalmente ausentes (Fig. 89B). Los elementos de vaso se encontraron menos afectados que las fibras, exhibiendo un contorno similar al del control. Los radios permanecieron estructurados (Fig. 89B, D). Las células del parénquima axial y radial aparecieron vacías, sugiriendo el colapso de las membranas. Las hifas se encontraron dentro del lumen de los elementos de vaso, fibras y células parenquimáticas, en contacto con las paredes internas y avanzando de célula en célula a través de las puntuaciones. Se observó una conspicua erosión de las cavidades de las puntuaciones (Fig. 89C, D).

En la madera afectada por *I. rickii*, en cortes ultrafinos, se observó una evidente degradación de la laminilla media entre las células, principalmente al nivel de la transición de los anillos de crecimiento y menos acentuada entre las fibras de los anillos de crecimiento (Fig. 89E). En general, la pared secundaria de los vasos se encontró colapsada, delgada, plegada y/o rota (Fig. 89E, F). En la proximidad de los elementos de vaso degradados se observaron bolsillos de fibras y parénquima axial parcial a completamente destruidos. Los radios permanecieron inalterados (Fig. 89F). La mayoría de las células del parénquima radial y axial aparecieron vacías, sugiriendo el colapso de

las membranas. Se observó abundante micelio en elementos de vasos y radios (Fig. 89F).

7.2. Microscopia electrónica

7.2.1. Microscopia electrónica de barrido

En la madera control, los elementos de vaso mostraron placas de perforación escalariformes y la pared secundaria con la superficie interna verrugosa (Fig. 90A). Las paredes secundarias lignificadas de fibras y parénquima axial y radial aparecieron gruesas y enteras (Fig. 90B).

En la madera afectada por *B. adusta*, los elementos de vaso exhibieron paredes secundarias con la superficie interna lisa, sugiriendo la completa degradación de las verrugas. En la pared exterior de los vasos se encontraron orificios, canales elongados axialmente acompañando a la hifa en avance (Fig. 90A, C), y coalescencia de las puntuaciones entre vasos (Fig. 90D). La delignificación progresiva luego de 3 meses causó un visible adelgazamiento y porosidad de las paredes secundarias de los vasos (Fig. 90E).

En la madera afectada por *I. rickii*, se produjo la degradación de la capa verrugosa en los elementos de vaso, el colapso de las membranas de las puntuaciones y el aumento del tamaño de las aperturas de las puntuaciones (Fig. 90A, F). Se observó la completa degradación de la laminilla media entre las fibras (Fig. 90G), clamidosporas en elementos de vasos y radios (Fig. 90H) y signos de laxitud en las paredes (Fig. 90I).

7.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

En la madera control, la laminilla media compuesta entre elementos de vasos, parénquima axial y radial y fibras, apareció electrónicamente densa. En todos los casos, las paredes secundarias mostraron el patrón de organización típico de microfibrillas de celulosa, con una capa verrugosa interna sólo presente en elementos de vaso y fibras (Fig. 91A-C). Las paredes secundarias de las fibras exhibieron tres capas distinguibles: S1, S2 y S3 (Fig. 91C). Las capas S1 y S3 fueron levemente más electrodensas que la capa S2 que se mostró más gruesa.

En la madera afectada por *B. adusta*, las paredes secundarias de los elementos de vaso mostraron un patrón heterogéneo de densidad electrónica. Las paredes secundarias en contacto con las hifas aparecieron traslúcidas con numerosos parches electrónicamente densos. La degradación de lignina (confirmado por la reducción de autofluorescencia de lignina) causó un arreglo laxo de las microfibrillas de celulosa. La laminilla media se exhibió electrónicamente densa (Fig. 91D). En las células del parénquima radial se pudo observar una degradación localizada de la pared celular causando la aparición de canales traslúcidos desde irregulares a elongados (Fig. 91E). Las paredes secundarias de las fibras no mostraron las típicas capas S1, S2 y S3 y en general éstas fueron menos densas que en el control. En la zona de contacto con la hifa, se pudieron reconocer laminillas concéntricas de diferente densidad (Fig. 91F).

En la madera afectada por *I. rickii*, las paredes secundarias de los elementos de vaso fueron electrónicamente más densas que las del tratamiento con *B. adusta*. Adyacente a la hifa se distinguió una banda electrodensa, extendida, discontinua y angosta (Fig. 91G). Las paredes secundarias del parénquima axial revelaron la existencia de áreas irregulares electrodensas entremezcladas con sitios traslúcidos (Fig. 91H). Las paredes secundarias de las fibras presentaron bandas electrodensas entremezcladas con otras más gruesas traslúcidas. La degradación de la lignina afectó la laminilla media causando separación de las fibras (Fig. 91I).

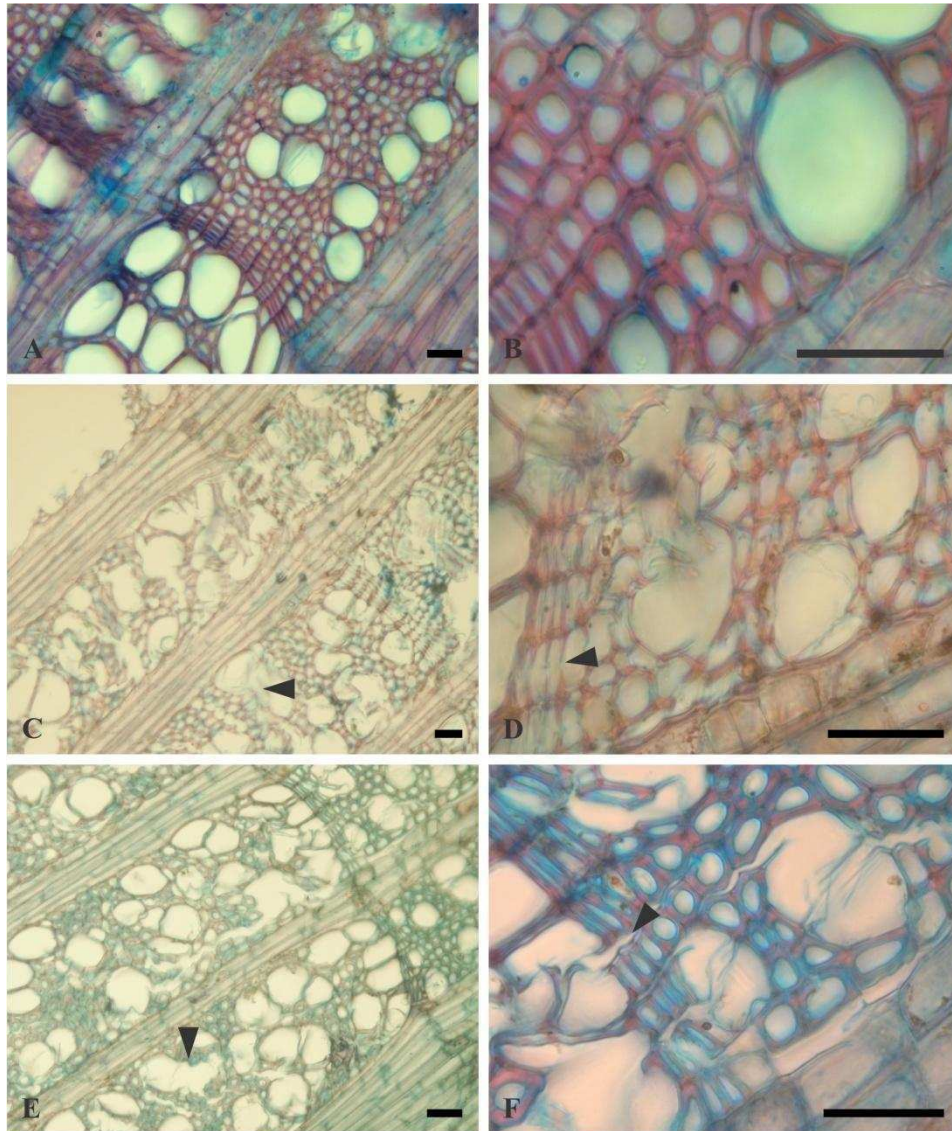


Figura 82: Coloración doble Safranina-Fast Green. Cortes transversales. **(A-B)** Madera control. **(C-D)** Madera afectada por *B. adusta*: **(C)** Destrucción de pared secundaria de vasos (flecha); **(D)** Rotura de pared tangencial de fibras en zona de transición de anillo de crecimiento (flecha). **(E-F)** Madera afectada por *I. rickii*: **(E)** Elementos de vaso con paredes plegadas (flecha); **(F)** Separación de fibras por degradación de laminilla media (flecha). Escala: 50 µm.

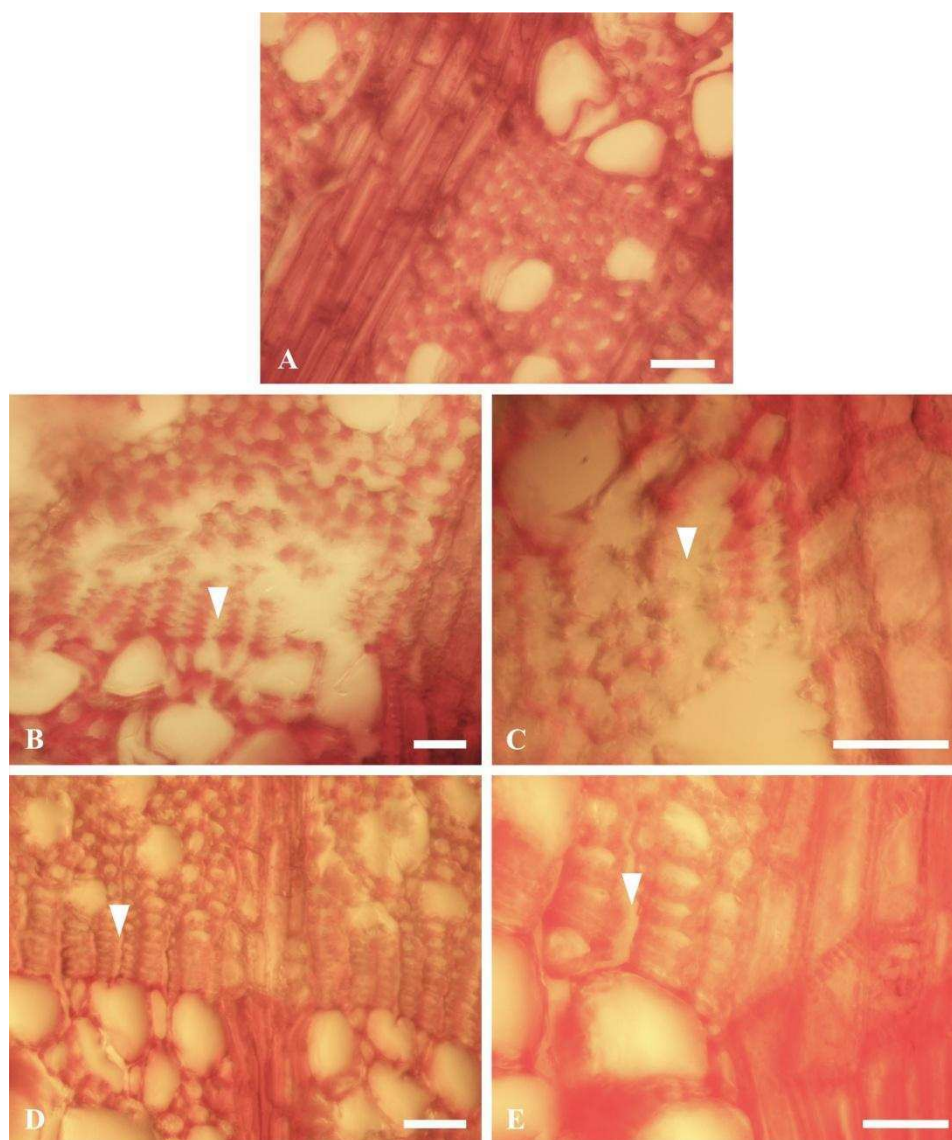


Figura 83: Test de fluoroglucinol- HCl. Cortes transversales. (A) Madera control. (B-C) Madera afectada por *B. adusta*: (C) Rotura de pared tangencial de fibras en zona de transición de anillo de crecimiento (flecha). (D-E) Madera afectada por *I. rickii*: (E) Separación de fibras por degradación de laminilla media (flecha). Escala: 50 µm.

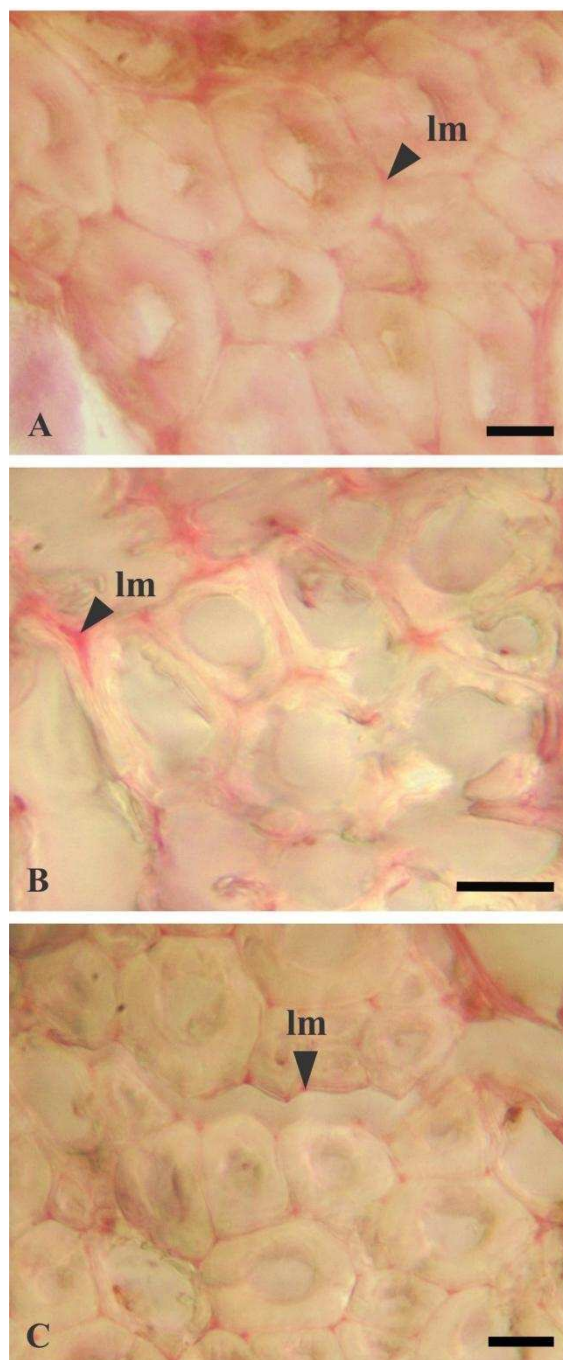


Figura 84: Coloración con rojo de rutenio. Cortes transversales. **(A)** Madera control. **(B)** Madera afectada por *B. adusta*. **(C)** Madera afectada por *I. rickii*. lm = laminilla media. Escala: 10 μ m.

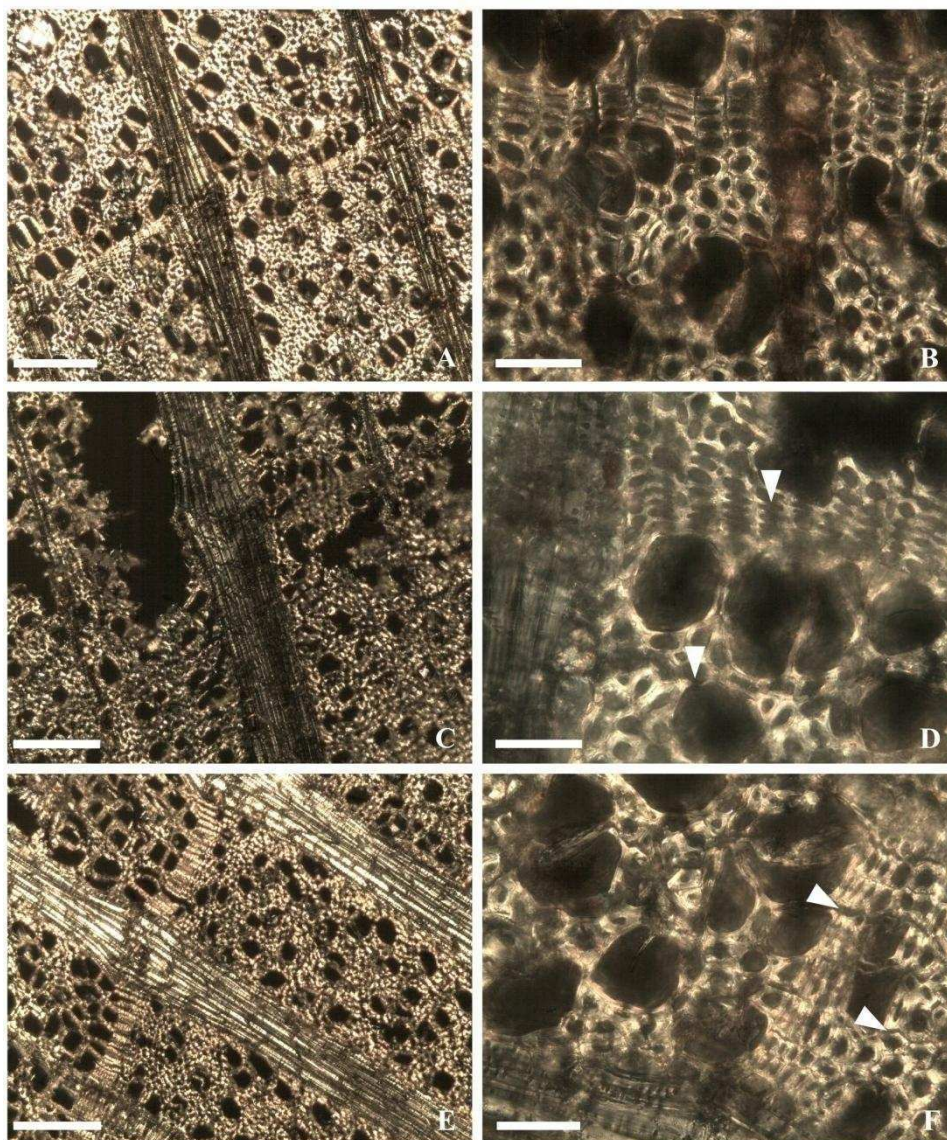


Figura 85: Micrografías ópticas con luz polarizada. Cortes transversales. **(A-B)** Madera control. **(C-D)** Madera afectada por *B. adusta*. **(D)** Degradación de pared de fibras en zona de transición de anillo de crecimiento (flechas). **(E-F)** Madera afectada por *I. rickii*. **(F)** Separación de fibras por degradación de laminilla media (flecha). Escala: A, C, D: 200 μm .; B, D, F: 50 μm .

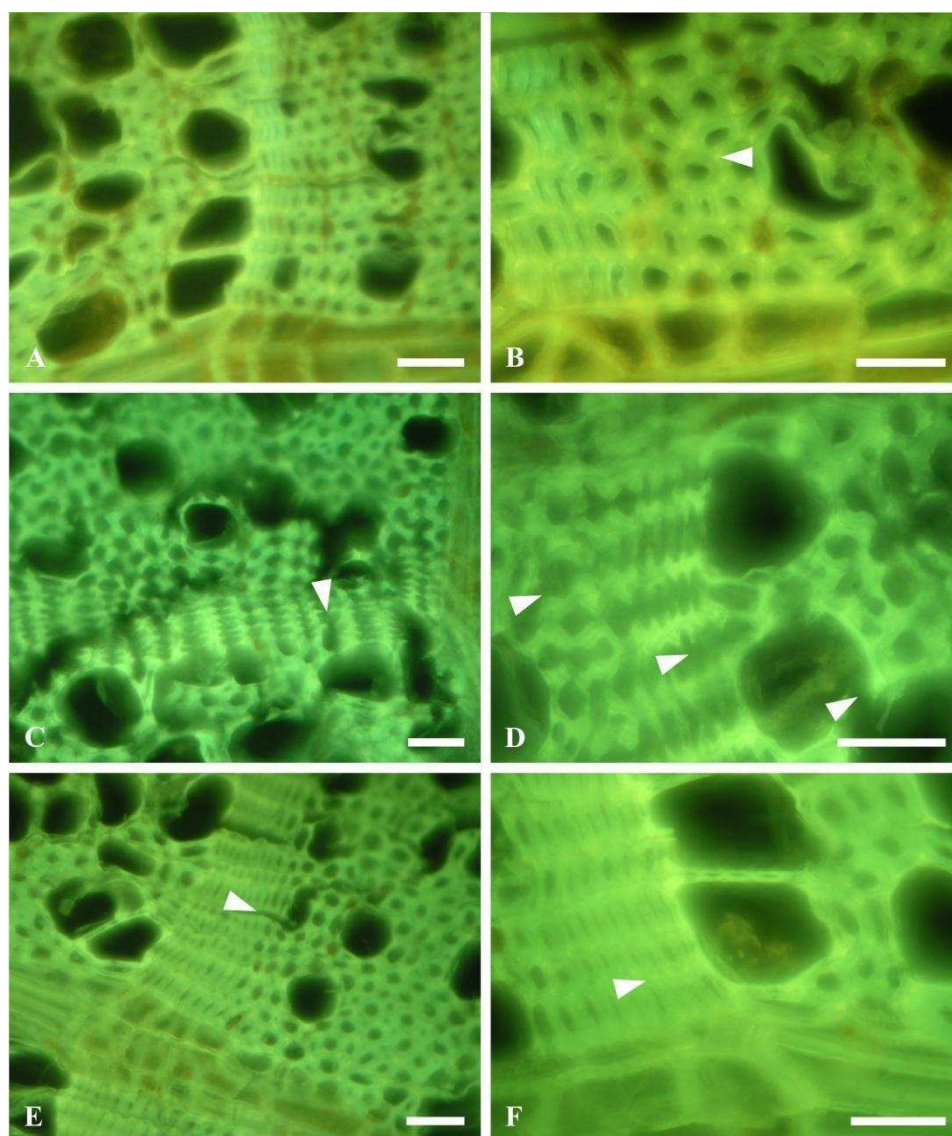


Figura 86: Micrografías ópticas en microscopio de epifluorescencia. Cortes transversales. (A-B) Madera control. Autofluorescencia de lignina en laminilla media (flecha). (C-D) Madera afectada por *B. adusta*: degradación y rotura de pared de fibras y vasos, principalmente en zona de transición de anillo de crecimiento (flechas). (E-F) Madera afectada por *I. rickii*. (E) separación de fibras por degradación de laminilla media (flecha), (F) pérdida de autofluorescencia de lignina en laminilla media (flecha). Escala: 50 μm .

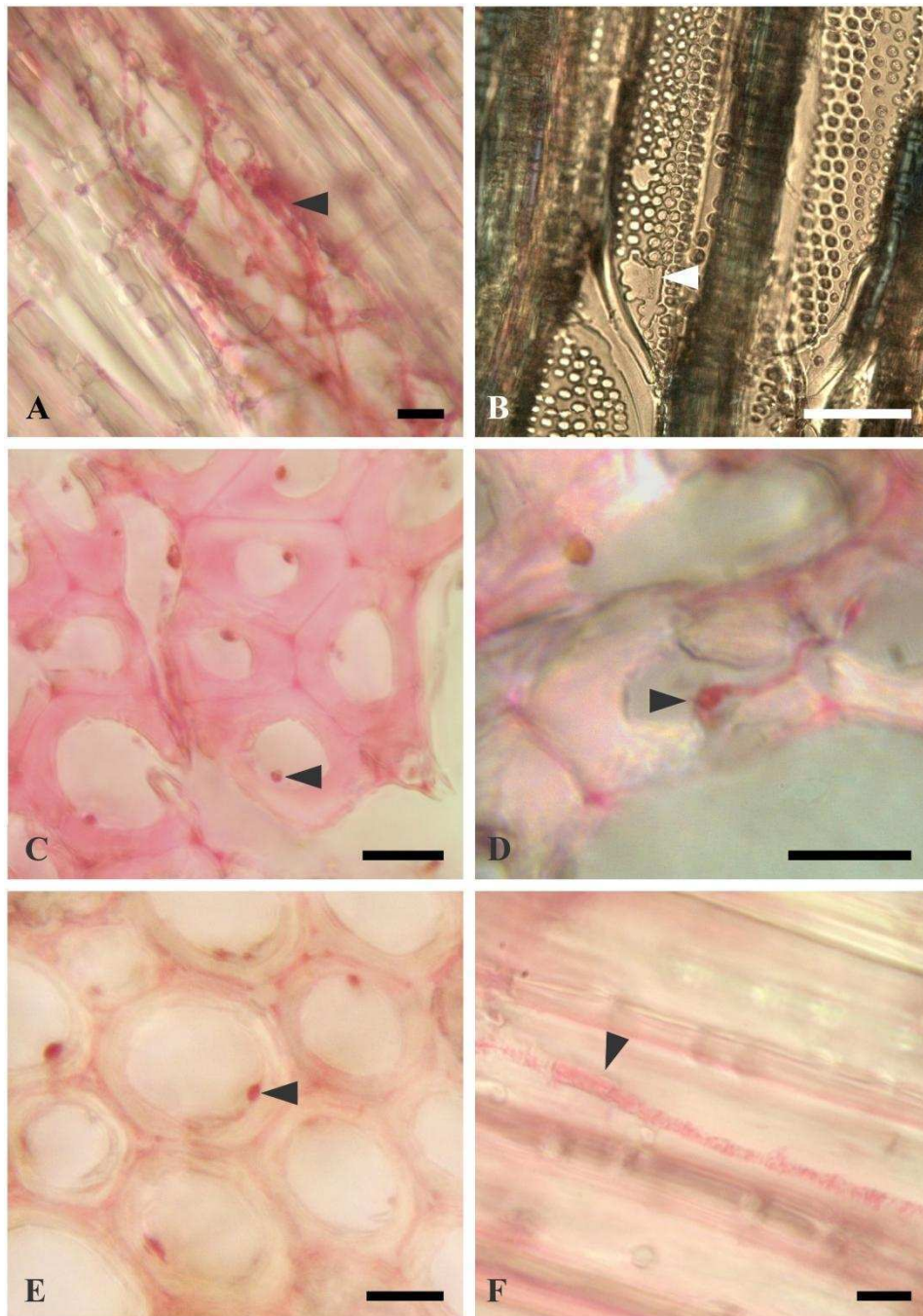


Figura 87: Madera afectada por *Bjerkandera adusta*. **(A)** Corte longitudinal. Coloración rojo de rutenio. Micelio en elemento de vaso (flecha). **(B)** Corte longitudinal. Pared secundaria de elemento de vaso erosionada por avance de hifa (flecha). **(C)** Corte transversal. Coloración rojo de rutenio. Hifa (flecha) en lumen de fibras. **(D)** Corte transversal. Coloración rojo de rutenio. Hifa a través de una puntuación fibra-fibra. **(E-F)** Corte longitudinal tangencial y radial respectivamente. Hifa (flecha) presente en células del radio. Escala: 10 µm en A, B, D-F; 50 µm en C.

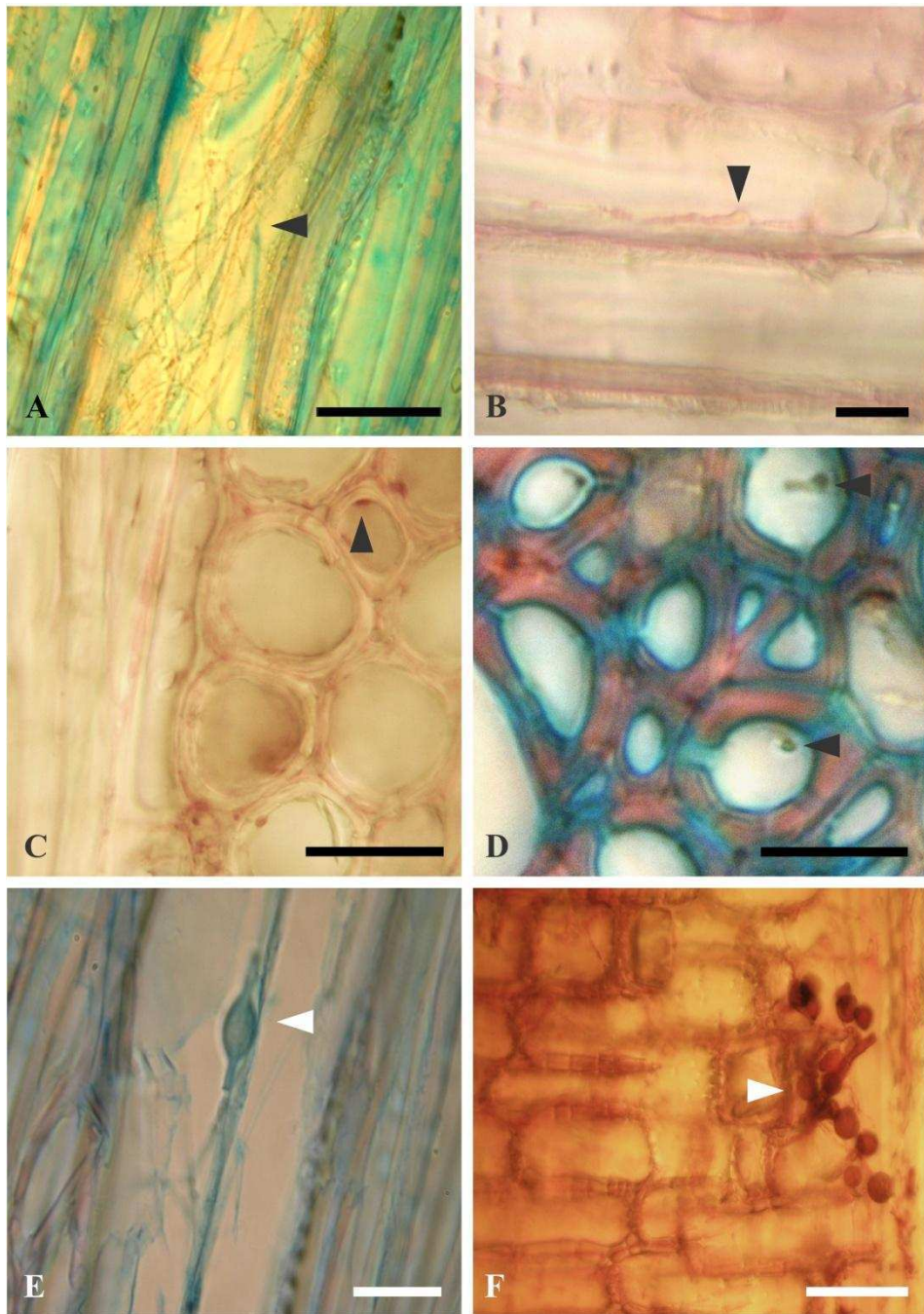


Figura 88: Madera afectada por *Inonotus rickii*. **(A)** Corte longitudinal. Coloración doble safranina - Fast Green. Micelio en elemento de vaso (flecha). **(B-C)** Corte longitudinal radial, coloración doble safranina – Fast Green y corte longitudinal tangencial, coloración rojo de rutenio. Presencia de hifa (flecha) en célula del radio. **(D)** Corte transversal. Coloración doble safranina - Fast Green. Hifas (flechas) presentes en lumen de fibras. **(E)** Corte longitudinal. Coloración doble safranina – Fast Green. Clamidospora (flecha) en elemento de vaso. **(F)** Corte longitudinal radial. Clamidosporas (flecha) en células del radio. Escala: 50 μm en A, F; 20 μm en B, C, D, E.

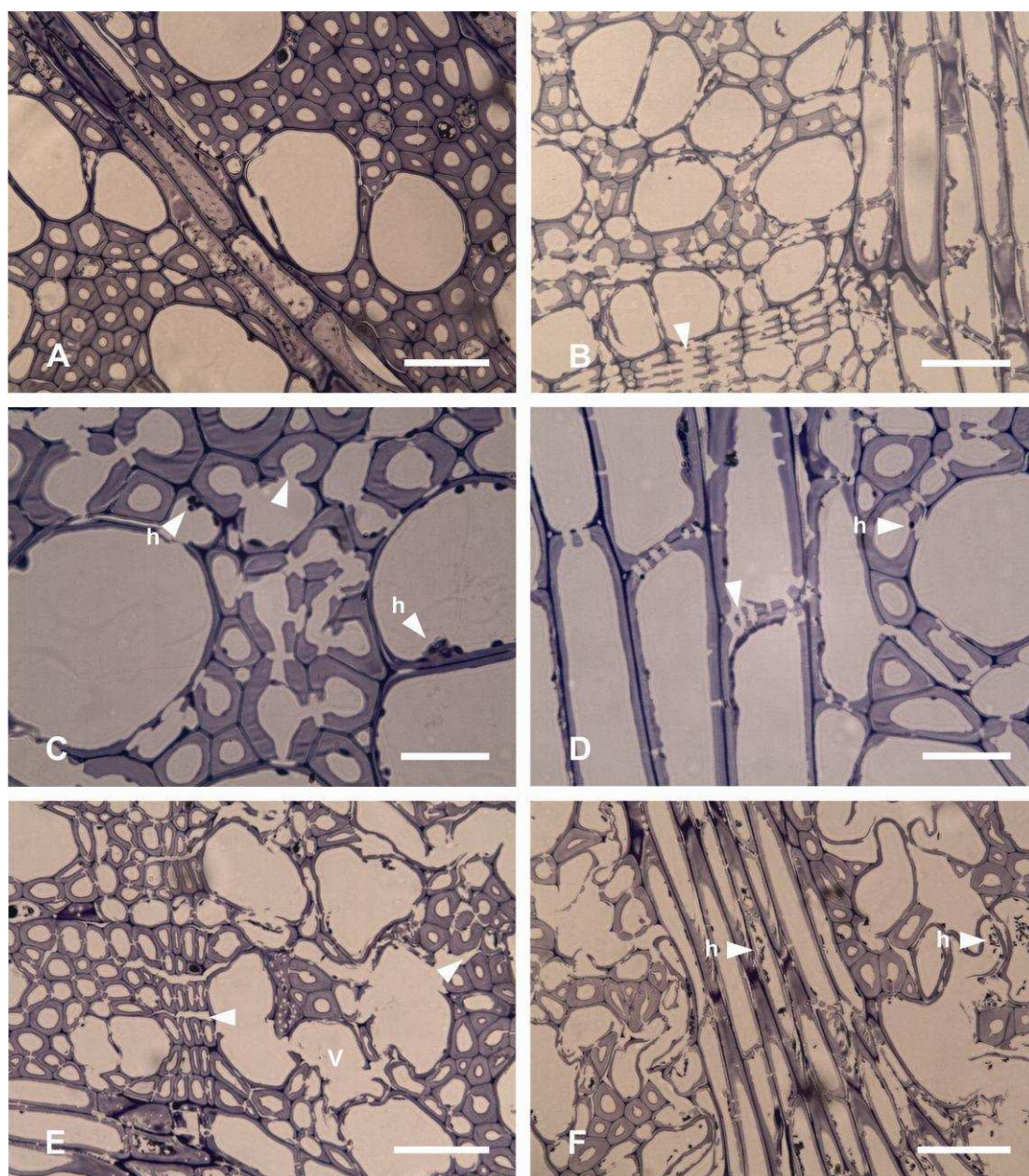


Figura 89: Degradación de madera de *Platanus acerifolia*. Cortes transversales coloreados con azul de toluidina. Micrografías ópticas. (A) Control. Vista general. (B) Tratamiento con *Bjerkandera adusta*. Radios y zona de transición del anillo con paredes tangenciales degradadas de fibras (flecha) y parénquima terminal. (C-D) Tratamiento con *B. adusta*. Colapso de membranas de puntuaciones fibra-fibra (flecha); diferentes grados de erosión de cavidades de las puntuaciones y presencia de hifas creciendo dentro de elementos de vaso, fibras y parénquima axial y radial. (E) Tratamiento con *Inonotus rickii*. Degradación de la laminilla media (flecha) y elementos de vaso con paredes colapsadas y plegadas. (F) Tratamiento con *I. rickii*. Abundante micelio en elementos de vaso y radios. h = hifa; v = elemento de vaso. – Escala: 50 μ m en A, B, E, F; 20 μ m en C, D.

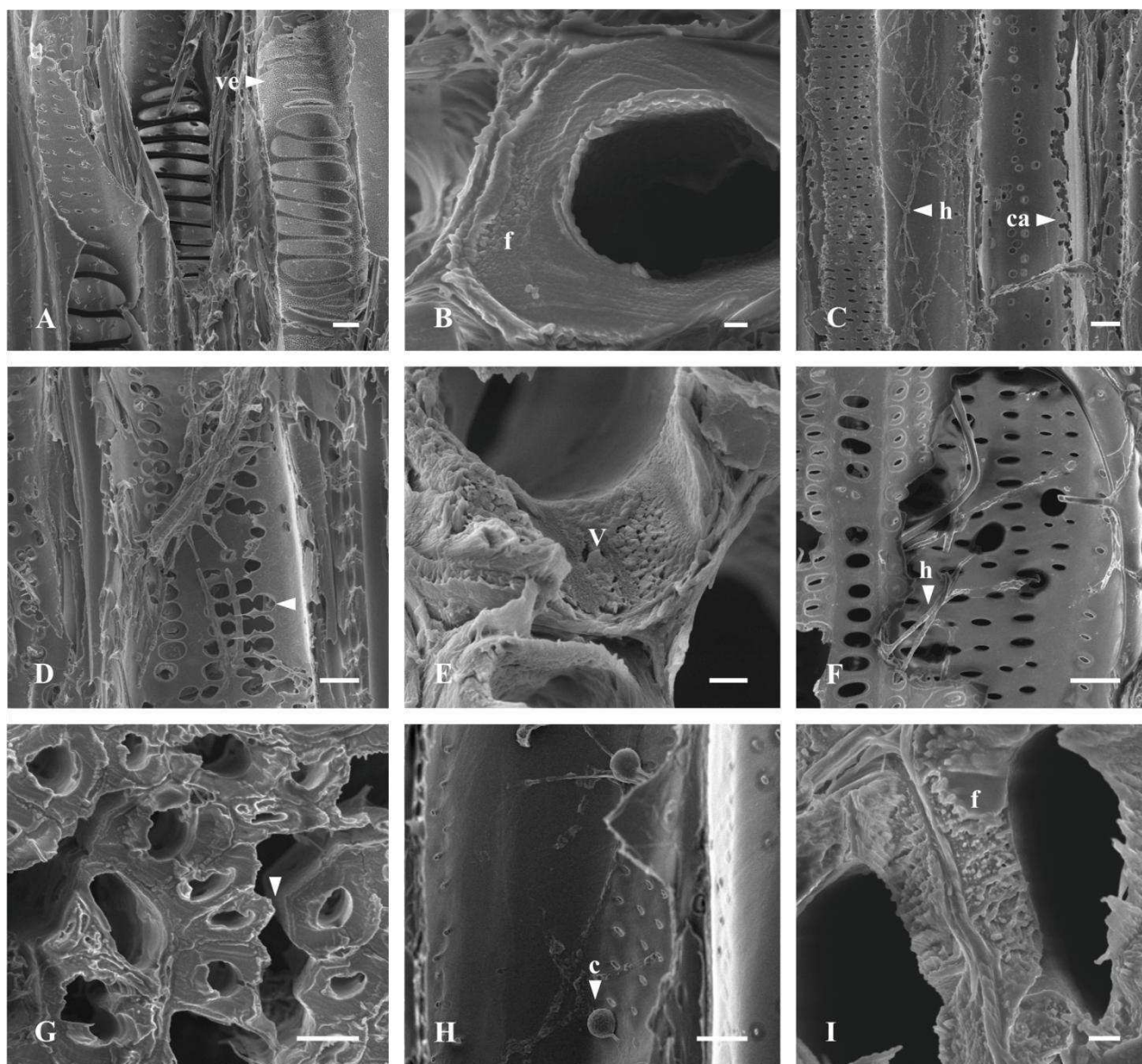


Figura 90: Degradación de madera de *Platanus acerifolia*. Micrografías SEM. **(A-B)** Control. Corte longitudinal y transversal, respectivamente, **(A)** placa de perforación escalariforme y pared secundaria con superficie interna verrugosa, **(B)** detalle de pared de fibra. **(C)** Tratamiento con *B. adusta*. Vasos con agujeros y canales elongados axialmente por el avance de hifas. **(D)** Tratamiento con *B. adusta*. Coalescencia de puntuaciones entre vasos por avance de hifas (flecha). **(E)** Tratamiento con *B. adusta*. Detalle de pared secundaria del vaso con visible debilitamiento y porosidad. **(F)** Tratamiento con *Inonotus rickii*. Avance de las hifas en contacto con las paredes internas, destrucción de membrana de las puntuaciones, aumento del tamaño de las aperturas de las puntuaciones y coalescencia progresiva de estas. **(G)** Tratamiento con *I. rickii*. Separación de fibras por degradación de la laminilla media (flecha). **(H)** Tratamiento con *I. rickii*. Presencia de clamidosporas en elemento de vaso. **(I)** Tratamiento con *I. rickii*. Detalle de pared secundaria de fibra con signos de porosidad. ca = canal axial; f= fibra; h = hifa; c = clamidospora; v = elemento de vaso; ve = verruga. – Escala: 10 μ m en A, C, D, F, G, H; 1 μ m en B, E, I.

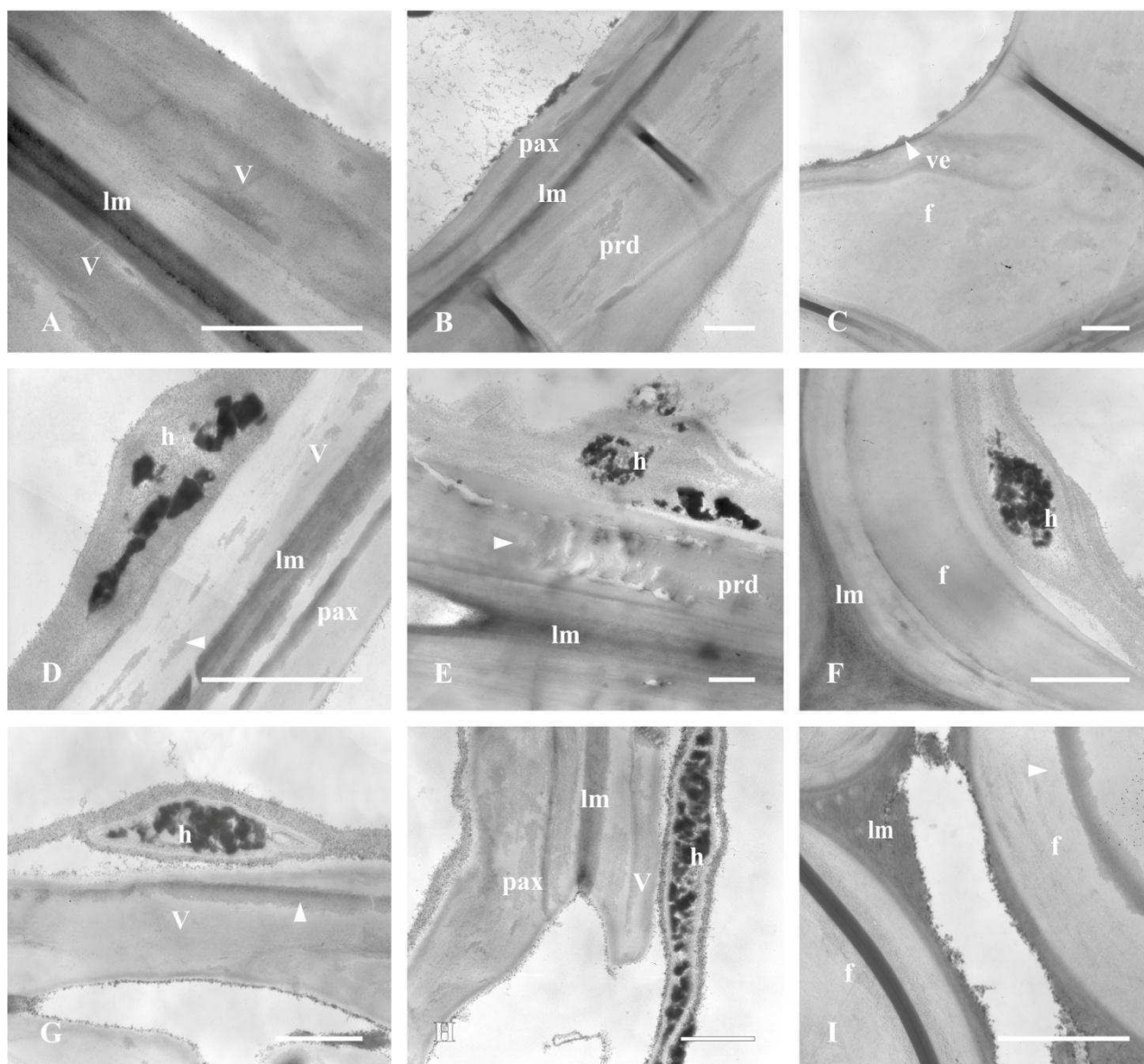


Figura 91: Degradación de madera de *Platanus acerifolia*. Micrografías TEM. (A-C) Madera control: (A) pared de elemento de vaso, (B) pared de parénquima axial y radial, (C) pared de fibra, con capa interna verrugosa. (D) Tratamiento con *B. adusta*. Elemento de vaso con un patrón heterogéneo de densidad electrónica. Presencia de un arreglo laxo de microfibrillas de celulosa (flecha) debido a la degradación de lignina. (E) Tratamiento con *B. adusta*. Células del parénquima radial con canales translúcidos irregulares a elongados (flecha). (F) Tratamiento con *B. adusta*. Pared de la fibra con laminillas concéntricas de diferente densidad. (G) Tratamiento con *I. rickii*. Pared de elementos de vaso con una angosta banda electrodensa estirada y discontinua. (H) Tratamiento con *I. rickii*. Pared secundaria del parénquima axial con áreas electrodensas irregulares. (I) Tratamiento con *I. rickii*. Pared de fibras con bandas electrodensas (flecha) y degradación de la laminilla media. pax = parénquima axial; f = fibra; h = hifa; lm = laminilla media; prd = parénquima radial; v = elemento de vaso; v = verruga. – Escala: 1 μm .



Discusión

Durante este estudio, por primera vez, se ha registrado la diversidad de endofitos en madera de plátano, un importante árbol urbano, se ha caracterizado la capacidad degradadora y patrones de degradación de varias especies xilófagas y se han aportado secuencias de cepas xilófagas argentinas.

1. Composición de la comunidad de endofitos

En el presente trabajo, se registraron 27 especies cultivables a partir de madera de plátanos sanos. Este estudio ha permitido caracterizar la comunidad endofítica de la madera de *Platanus acerifolia* y analizar si su biodiversidad está relacionada con factores que predisponen a la biodegradación de la madera. Ya en un estudio previo (Unterseher *et al.*, 2013) se planteó que los patrones de diversidad obtenidos a partir de la obtención y caracterización de endofitos fúngicos en cultivo es un reflejo de los patrones de biodiversidad reales.

A nuestro conocimiento, el presente es el primer estudio sobre hongos endofíticos en este hospedante o en miembros de la familia Platanaceae y es, al mismo tiempo, el primer estudio realizado sobre árboles urbanos, por lo cual no existen datos disponibles para realizar una comparación directa. La riqueza de especies obtenida es ligeramente menor a la reportada para *Acer truncatum*, con un esfuerzo de muestreo similar (35 especies a partir de 30 individuos) (Sun *et al.*, 2011). Las curvas de acumulación de especies indican que serían necesarios muestreos adicionales para tener una noción precisa de la diversidad de la comunidad endofítica fúngica de *P. acerifolia* y mayor cantidad de estudios para entender las causas de las diferencias en las riquezas observadas.

La mayoría de las especies y aislamientos correspondieron a ascomicetes, aun cuando se utilizó un medio selectivo para basidiomicetes junto con un medio menos restrictivo (MEA). La predominancia del phylum Ascomycota como una característica de la micobiota endofítica y la baja detección de basidiomicetes endofíticos en hospedantes leñosos y no leñosos, aún utilizando medios selectivos, ha sido previamente registrada por Gazis & Chaverri (2010) y Hoff *et al.* (2004). Probablemente sea consecuencia de una alta diversidad presente en el sustrato y a la plasticidad propia de los miembros de este phylum. *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporioides*, especies muy frecuentes en este estudio, han resultado

endofitos fúngicos dominantes en trabajos previos en madera (Ragazzi *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2011) y son frecuentemente encontradas como endofitos de hojas (Fisher *et al.*, 1994) sugiriendo la alta capacidad de ambas especies de explotar diferentes nichos ecológicos y estrategias nutricionales.

La mayoría de los géneros de las especies identificadas en este estudio han sido citados como endofitos de madera en varios hospedantes leñosos (Bettucci *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2011; Tejesvi *et al.*, 2005; entre otros). Sin embargo, *Aspergillus reptans*, *Aspergillus ustus* y *Bipolaris australiensis* son reportados por primera vez como endofitos de madera. Al mismo tiempo, *Coprinopsis cinerea*, *Granulobasidium vellereum*, *Inonotus rickii*, *Pseudallescheria boydii* y *Trichosporon sporotrichoides* son citados por primera vez como endofitos. Esto podría señalar una diversidad particular para este hospedante o, más probablemente, muestre la frecuente omisión de miembros del phylum Basidiomycota en los estudios de este grupo funcional de organismos. Aún cuando la mayoría de los taxones han sido citados para la Argentina (Allegrucci *et al.*, 2009; Esquivel *et al.*, 2003; Mangiaterra *et al.*, 2006; Novas & Carmarán, 2008; Robles *et al.*, 2011; entre otros), este estudio constituye el primer reporte para el país de *C. cinerea*, *G. vellereum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phialemonium curvatum* y *T. sporotrichoides*.

La mayoría de las especies recuperadas (70%) estuvieron representadas por más de un aislamiento, lo que sugiere que la microbiota endofítica de *P. acerifolia* está dominada por especies frecuentes, en contraste con especies ocasionales (con 1 aislamiento). Este patrón ha sido observado en otras comunidades endofíticas, como la presente en madera de *Vitis vinifera* (González & Tello, 2010).

2. Análisis integral de basidiomicetes

Las 7 especies de basidiomicetes registradas mostraron distintas estrategias: 2 aisladas como patógenos (*Coprinellus micaceus* e *Hymenochaete* sp.), 4 como endofitos (*C. cinerea*, *G. vellereum*, *P. chrysosporium* y *T. sporotrichoides*) y sólo una aislada tanto como patógeno como endofito (*I. rickii*). Cabe destacar que *Inonotus rickii* y *C. micaceus* han sido previamente registradas en plátanos de la Ciudad de Buenos Aires (Robles *et al.*, 2011) y *Coprinopsis cinerea*, *G. vellereum*, *T. sporotrichoides* y el género *Hymenochaete* son citados por primera vez para este hospedante.

Es interesante notar que tanto *I. rickii* como *P. chrysosporium* son hongos de pudrición blanca muy estudiados que afectan a varias angiospermas (Stalpers, 1978; Wright & Iaconis, 1955). Sin embargo, en este trabajo fueron detectados en madera de árboles sanos, tal como ha sido reportado para otras especies de los géneros *Inonotus* y *Phanerochaete* (Crozier *et al.*, 2006; Oses *et al.*, 2008). Varios estudios han sugerido que hongos aislados como endofitos podrían ser patógenos latentes, o saprófitos que actuarían como colonizadores primarios al morir el árbol (Carroll, 1988; Promputtha *et al.*, 2007; Saikkonen *et al.*, 1998). Los resultados mencionados, junto con la detección en árboles sanos de miembros de la familia Xylariaceae como es el caso de *Nodulisporium*, los cuales frecuentemente producen pudrición blanca (Worrall *et al.*, 1997), parecen confirmar esta hipótesis y sugieren que existe colonización fúngica de hongos potencialmente degradadores de madera en plátanos urbanos aparentemente sanos.

3. Análisis filogenéticos

Los estudios de secuenciación de ADN permitieron corroborar ciertas identificaciones morfológicas y establecer diversas relaciones entre cepas.

En el caso de *Coprinopsis cinerea*, *Granulobasidium vellereum* y *Phanerochaete chrysosporium*, las herramientas moleculares coincidieron con los establecidos morfológicamente, permitiendo corroborar identificaciones en base a caracteres de cultivo. En el caso de la cepa BAFCcult 4384, los análisis moleculares permitieron confirmar la ubicación de esta dentro del género *Hymenochaete*, pero no fueron suficientes para establecer la especie. Como se ha mencionado ya en trabajos como el de Robles *et al.* (2012), entre otros, la falta de secuencias de cepas regionales es un limitante en la utilización de los estudios moleculares como herramientas taxonómicas, para lo que es necesario incrementar el tamaño de las bases de datos principalmente con secuencias de poblaciones locales.

Para las secuencias de las cepas previamente identificadas por caracteres morfológicos como *Nodulisporium* y de aquellas previamente identificadas como *Inonotus rickii* fue posible establecer también relaciones entre cepas endofíticas y patogénicas. En el caso de *Nodulisporium*, si bien no fue posible recuperar los mismos clados en los diferentes tipos de análisis, es importante resaltar que, para ambos

regiones de ADN evaluadas y bajo los distintos análisis realizados, se observaron clados (grupos hermanos) conformados tanto por cepas endofíticas como patogénicas. Resultados similares se obtuvieron para las secuencias de *I. rickii*. Se observó bajo homologías estáticas para la región ITS, que las secuencias endofíticas y patogénicas se ubicaron en un mismo clado. Si bien no fue posible recuperar los mismos clados al utilizar las secuencias de β -tubulina, se observó nuevamente la asociación en clados hermanos de cepas saprofíticas y endofíticas, bajo ambos tipos de análisis de homologías. Estos resultados sugieren que las cepas se encuentran genéticamente muy relacionadas aun cuando presenten diferentes estrategias de colonización en la madera. Crozier *et al.* (2006) y Thomas *et al.* (2008) realizaron estudios filogenéticos solamente sobre cepas endofíticas, resultando que muchas de ellas correspondían a basidiomicetes pertenecientes a linajes filogenéticos de hongos de pudrición, como Polyporales y Corticiales. Sugirieron que estos organismos podrían haber adoptado una fase asintomática en su ciclo de vida, en los cuales se encuentran “inactivos” hasta que adoptan una fase saprofítica al morir el tejido del hospedante o patogénica. Los resultados de este trabajo apoyan esta hipótesis, mostrando además la relación entre cepas endofíticas y patogénicas aisladas en el plátano.

4. Relación entre disturbio antrópico, edad de los árboles y diversidad de endofitos

Se analizó conjuntamente la relación entre los sitios estudiados en cuanto a, nivel de disturbio antrópico, diámetro a la altura del pecho (DAP) de los arboles inspeccionados, riqueza estimada y diversidad de endofitos totales, riqueza observada y diversidad de los basidiomicetes aislados como endofitos, y riqueza observada y diversidad de los basidiomicetes patógenos. Los resultados obtenidos mostraron que la riqueza estimada de endofitos se asoció positivamente con la edad de los árboles, correspondiendo los valores más altos de DAP con los valores más altos de riqueza estimada de endofitos. Un patrón similar fue reportado por Sieber (2007) en hojas de *Picea mariana* y *Pinus strobus*, donde la frecuencia de colonización por endofitos se incrementó con la edad de las hojas. Sieber postuló que para estos sistemas las hojas entrarían en senescencia al alcanzarse un valor umbral de densidad de colonización de endofitos. En este valor umbral los endofitos reanudarían su crecimiento, matarían las

hojas y esporularían. En condiciones normales se alcanzaría la densidad umbral junto con la senescencia natural de la hoja pero bajo condiciones adversas, como falta de luz, el aumento de la densidad de endofitos podría acelerarse y conducir a una senescencia prematura. Si bien se tejidos con diferentes características, una situación similar podría ocurrir en la madera por la cual al alcanzarse una densidad umbral de endofitos potencialmente xilófagos estos dejarían su fase de latencia y adoptarían una estrategia degradadora de la madera.

A partir de los resultados del Análisis Canónico de Correspondencias (CCA) se identificaron 3 grupos de taxones en base al DAP, porcentaje de basidiomicetes en árboles enfermos y nivel de disturbio antrópico de los diferentes sitios de muestreo. De los factores incluidos en el análisis el nivel de disturbio antrópico fue el que mostró una mayor influencia en la conformación de los grupos de especies. El grupo I comprendió a especies relacionadas con un bajo nivel de disturbio antrópico, árboles con bajos valores DAP y ausencia de basidiomicetes en árboles enfermos cercanos, lo que se correspondió con el Sitio D. El grupo II se encontró conformado por especies asociadas a altos valores de disturbio antrópico, en relación a los Sitio B y C. Finalmente el grupo III incluyó a especies asociadas a árboles sanos con altos valores DAP y mayor presencia de basidiomicetes en árboles enfermos cercanos (Sitio A). Estos resultados se diferencian de lo observado por Robles *et al.* (2011), en el cual la edad (estimada a partir de los valores de DAP) del total de árboles del sitio de muestreo, y en particular de los árboles sintomáticos muestreados, resultaban un factor de importante influencia para la comunidad de basidiomicetes patogénicos en plátano. En el plátano los factores que más influyen en la comunidad endofítica parecen ser diferentes a los de mayor influencia para la comunidad de basidiomicetes patogénicos. En el caso de los endofitos el disturbio antrópico podría influir diferencialmente sobre la supervivencia y colonización de las especies fúngicas. El efecto de los contaminantes sobre la frecuencia y composición endofítica ha sido poco explorado. Sin embargo, algunos trabajos (Barengo *et al.*, 2000; Kowalski *et al.*, 1998) han reportado que la contaminación del aire influye sobre la comunidad endofítica de hojas y madera de especies de *Betula*.

Al mismo tiempo, a partir del CCA, se observó una relación positiva entre presencia de especies de basidiomicetes endofíticos y de basidiomicetes patógenos, incluyendo una especie, *I. rickii*, con ambas estrategias. El sitio que presentó mayor riqueza y número de aislamientos de basidiomicetes patógenos (Sitio A) fue también el

que presentó mayor riqueza y aislamientos de basidiomicetes endofíticos. Este resultado indicaría que árboles sintomáticos son fuente de inóculo que aumenta la posibilidad de colonización de árboles cercanos en apariencia sanos.

Finalmente, en cuanto a la presencia de basidiomicetes en árboles sintomáticos Robles *et al.* (2011) describieron una asociación positiva entre los valores DAP y la abundancia de basidiomicetes en los ejemplares muestreados y sugirieron que la edad de los árboles sería un factor que favorecería la degradación de la madera en árboles urbanos. En este trabajo no se obtuvo el mismo resultado en los árboles sintomáticos muestreados, probablemente debido al bajo número de basidiomicetes patógenos obtenidos.

5. Reacciones de oxidasas y estudios de degradación *in vitro*

Todas las cepas evaluadas causaron una pérdida de peso seco significativa en los bloques de madera de *P. acerifolia*, a excepción de la cepa de *G. vellereum*. Sin embargo, la presencia e intensidad de las zonas de difusión en los ensayos de oxidasas no presentó una relación clara con esos resultados.

Los estudios de degradación *in vitro* permiten evaluar la capacidad degradadora de diferentes especies de un modo comparativo, a pesar de que no pueden ser consideradas como un indicador absoluto del comportamiento de estos hongos. Bajo las condiciones controladas utilizadas en este estudio, *P. chrysosporium* resultó la especie más agresiva, produciendo una pérdida de peso seco de la madera de alrededor de 22% luego de 3 meses, un porcentaje ligeramente menor que el causado por *B. adusta* (Robles *et al.*, 2011). Estudios previos señalan que la capacidad degradadora de esta especie puede ser muy variable, aún con cepas distintas que afectan el mismo tipo de madera. Existen reportes para esta especie de ensayos *in vitro* sobre madera de abedul (*Betula papyrifera* Marsh) causando entre 13 y 55% de pérdida de peso seco (Blanchette *et al.*, 1992; Otjen *et al.*, 1987) luego de 12 semanas. En madera de álamo (*Populus tremuloides* Michx.), cepas de esta especie causaron pérdidas de peso de entre 8 y 70% luego de 12 semanas (Blanchette *et al.*, 1992). Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de pérdida de peso obtenido para otras especies de angiospermas. En gimnospermas, se reportó una pérdida de peso de 14% en madera de pino (*Pinus strobus* L.) luego de un ensayo de 12 semanas, y pérdidas de peso de entre 9 y 13% en madera de *Picea abies*

(L.) H. Karst (píceas común), luego de 10 semanas (Hakala *et al.*, 2004). En este trabajo, *Phanerochaete chrysosporium* no produjo zonas de difusión en los medios evaluados, aun cuando es un hongo de pudrición blanca en angiospermas y gimnospermas. Esta característica ha sido señalada previamente por Nakasone (1990). Es interesante resaltar que la cepa estudiada de *P. chrysosporium* ha mostrado poseer habilidad para descomponer la madera, a pesar de que fue aislada de madera de un árbol asintomático, siendo estos resultados congruentes con la hipótesis de que se trata de organismos capaces de explotar diferentes hábitats en diferentes momentos de su ciclo de vida.

Ambas cepas de *Nodulisporium*, una aislada como endofito y otra como patógeno, fueron las siguientes cepas más agresivas con porcentajes de pérdida de peso de 19% y 16%, respectivamente. Exhibieron patrones de difusión similares entre sí, excepto en el medio con ácido tánico, además de que produjeron pérdidas de peso similares, sin diferencias significativas, en los ensayos de degradación. El género *Nodulisporium* comprende formas anamórficas de especies del orden Xylariales. Algunos trabajos evalúan la pérdida de peso seco de la madera causada por cepas de géneros como *Daldinia* e *Hypoxylon*. Diferentes cepas de *Daldinia concentrica* causaron pérdidas de peso de entre 18 y 38% en bloques de madera de abedul (*Betula alleghaniensis* Britton) y de 2-2,8% en bloques de madera de pino (*Pinus taeda* L.), luego de 12 semanas de ensayo. Por su parte *Hypoxylon atropunctatum* e *Hypoxylon mammatum* causaron pérdidas de peso más bajas en los mismos tipos de madera en el mismo tiempo (0,4-14% en madera de abedul y 0,8-3,3% en madera de pino) (Worrall *et al.*, 1997). Las cepas de este trabajo mostraron un comportamiento más cercano al exhibido por *Daldinia* para otras angiospermas.

La cepa de *Hymenochaete* produjo intensas zonas de difusión pero mostró una baja capacidad degradadora, similar estadísticamente a la de *Coprinopsis cinerea*. Existen reportes de pérdida de peso producida por diferentes especies de *Hymenochaete*, que presentaron una mayor capacidad degradadora que la exhibida por la cepa obtenida durante este trabajo. *Hymenochaete rubiginosa* produjo 34% de reducción de peso en bloques de madera de abedul (*B. papyrifera*) y 2% en bloques de madera de pino (*Pinus strobus*.), luego de 12 semanas (Otjen *et al.*, 1987). Diferentes especies de *Hymenochaete* evaluadas en madera de sauce criollo (*Salix humboldtiana* (Willd.)) produjeron pérdidas de peso que variaron entre 2,4–6% luego de 2 meses, entre 4,5–17,5% luego de 4 meses, y entre 5–39% luego de 6 meses. *Hymenochaete leonina*

resultó la especie más agresiva hacia el final de ensayo, seguido por *Hymenochaete sallei* (Job & Wright, 1986). A pesar de la variabilidad de capacidad degradadora que presentan las especies de *Hymenochaete*, la cepa encontrada en este trabajo no resultó riesgosa en cuanto a su potencial degradador para la madera de plátano.

La cepa de *I. rickii* causó una pérdida de peso significativa en la madera de plátano, además de presentar zonas de difusión en todos los medios evaluados. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Robles *et al.* (2011) y Wright & Iaconis (1955) para el potencial degradador *in vitro* y las reacciones de oxidasas de esta especie, respectivamente. Los resultados de oxidasas específicamente fueron semejantes a los encontrados previamente para una cepa patógena de *I. rickii* (Robles *et al.*, 2011). Estos resultados indican que a pesar de haber sido aislada como endofito esta cepa muestra un comportamiento patogénico, sugiriendo que se trata de un patógeno en estado latente. Como antecedente, Promputtha *et al.* (2010) investigaron la capacidad de especies aisladas de hojas como endofitos y como saprófitos para producir enzimas en medio artificial y observaron que ambos estadios producían las mismas enzimas *in vitro*, lo que apoya la hipótesis de que estos endofitos tienen la capacidad de cambiar su estrategia de colonización a saprótrofos durante la senescencia de la hoja.

Bjerkandera adusta, *Oxyporus latemarginatus* y *Trametes trogii* resultaron las tres especies más agresivas en cuanto a su capacidad de degradación en madera de plátano en ensayos previos (Robles *et al.*, 2011). A partir de los resultados del presente trabajo se sugiere agregar a *Phanerochaete chrysosporium* y *Nodulisporium* como especies similarmente riesgosas.

Los estudios presentados en este trabajo constituyen los primeros ensayos sobre la capacidad degradadora *in vitro* de las especies *C. cinerea* y *G. vellereum*. El bajo porcentaje de pérdida de peso seco causado por *G. vellereum* y la relativamente alta frecuencia en que fue registrado como endofito lo califican para ser evaluado como un potencial biocontrolador de especies patógenas.

6. Ensayos de control biológico

Las cepas endofítica y saprofítica de *Trichoderma harzianum* y la cepa de *G. vellereum* causaron una inhibición de crecimiento de los basidiomicetes xilófagos considerados en este estudio, principalmente cuando su inoculación fue previa a la del

patógeno. El crecimiento de las colonias de estos antagonistas sobre las colonias de los xilófagos (sobrecrecimiento) en medio sintético y en el caso de *G. vellereum*, junto con la disminución del porcentaje de pérdida de peso seco por parte de los xilófagos evaluados, sugiere la existencia de una inhibición por competencia por recursos y espacio o la producción de metabolitos secundarios que podrían afectar el micelio del xilófago, como en el caso de la zona de contacto entre *T. trogii* y *T. harzianum*. Es necesario realizar más estudios para investigar más extensamente ambas alternativas.

Trichoderma es un género muy estudiado en cuanto a su potencial como antagonista, ya que tiene la capacidad de usar varias estrategias de biocontrol, como competencia por los nutrientes, parasitismo del hongo hospedante (a través de penetración hifal), producción de enzimas extracelulares, producción de compuestos fungistáticos y producción de enzimas hidrolíticas que inducen una inhibición de la patogenicidad. Algunas cepas incluso promueven el crecimiento de la planta e inducen la resistencia de esta hacia los patógenos (Monte, 2001). Entre las especies que han demostrado capacidad biocontroladora de hongos de pudrición en ensayos *in vitro* se puede mencionar a *Trichoderma atroviride* (Schubert *et al.*, 2008), *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride* (Bruce & Highley, 1991), *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma longibrachiatum* (Lee *et al.*, 2012) y *Trichoderma harzianum* (Bianchinotti & Lopez, 1999; Lee *et al.*, 2012). Las cepas de *T. harzianum* de este trabajo también han mostrado una capacidad biocontroladora de hongos xilófagos comunes en el arbolado urbano principalmente como primeros colonizadores. Estos estudios deberían complementarse con estudios *in vitro* sobre madera.

Por otro lado, existen diversos estudios de basidiomicetes como biocontroladores de hongos de pudrición. Una especie muy estudiada es *Phlebiopsis gigantea* como biocontrolador del patógeno *Heterobasidium annosum* (Sun, 2011) y también se ha evaluado el efecto antagonista de especies como *Resinicium bicolor* (Woods *et al.*, 2005) y *Melanotus proteus* (Redfern, 1991) contra *H. annosum* e *Hypholoma* sp. contra *Armillaria luteobubalina* (Pearce & Malajczuk, 1990). Este es el primer estudio para la Argentina de un basidiomicete como potencial biocontrolador de hongos xilófagos. Asimismo, no existen registros previos de *G. vellereum* como potencial antagonista de hongos de pudrición. Los resultados indican que, como primer colonizador, esta especie podría reducir el crecimiento de ciertos hongos xilófagos comunes en el arbolado urbano. Es necesario ampliar estos estudios realizando ensayos con otras especies.

Inonotus rickii fue inhibido, en mayor o menor medida, por todos los antagonistas evaluados, tanto en los ensayos de confrontación en cultivos duales como en los ensayos *in vitro* de confrontación en madera sin importar el orden de inoculación del antagonista. El resto de los xilófagos evaluados mostraron mayor tolerancia frente a estos antagonistas y sólo fueron afectados por *G. vellereum* al ser inoculados posteriormente a este. Estos resultados se condicen con lo expresado por Highley (1990) en cuanto a que los xilófagos más agresivos y de mayor velocidad de crecimiento son los que mejor respuesta de resistencia presentan ante el antagonista.

7. Estudios histológicos

Bjerkandera adusta e *I. rickii* son dos de los hongos xilófagos más importantes del arbolado urbano de la Ciudad de Buenos Aires, ya indicado por Robles *et al.* (2011). Nuestros resultados brindan una extensiva descripción de los patrones de degradación producidos por *B. adusta* e *I. rickii*, involucrando un enfoque micro y ultra estructural. La microscopia óptica y electrónica mostró las principales alteraciones de la pared celular y dos patrones diferentes de pudrición blanca en madera de plátano en estadios tempranos de degradación.

Bjerkandera adusta exhibe una degradación más agresiva de la madera, afectando principalmente las paredes de las fibras, reduciendo la rigidez y la resistencia de la madera. Por otra parte, *I. rickii* exhibe un patrón de delignificación selectiva el cual causa una pérdida conspicua de la lignina en la laminilla media entre las fibras y un ataque de las paredes de los vasos, con posibles consecuencias en la eficacia de la conductividad xilemática.

Los vasos se consideran elementos xilemáticos extremadamente resistentes al ataque por parte de ciertos hongos de pudrición blanca. Se conoce que altas concentraciones de lignina en las paredes de los vasos, diferencias en la distribución de lignina en las capas de la pared y la composición de los monómeros de lignina son algunos de los factores principales que contribuyen a la integridad de los vasos luego de un ataque fúngico. En general, los vasos tienen una relación entre unidades guaiacyl/syringyl mayor que otras células (Blanchette *et al.*, 1987; Nilsson & Daniel, 1989) y la lignina tipo guaiacyl sería más difícil de degradar que la lignina tipo syringyl (Blanchette *et al.*, 1990). Levin & Castro (1998) y Luna *et al.* (2004) observaron que, en

madera de álamo afectada por *T. trogii*, *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma lucidum*, los vasos eran las células más resistentes. La degradación preferencial de las paredes de los vasos por parte de *I. rickii* y la integridad estructural de estos en la madera afectada por *B. adusta* indican que el sistema enzimático de estas especies difieren en sus acción sobre la lignina. Serían necesarias más investigaciones bioquímicas para confirmar esta hipótesis. En *B. adusta* se han detectado numerosas enzimas involucradas en la degradación de la lignina, tales como LiP (lignina-peroxidasa), MnP (manganeso peroxidasa) y VP (peroxidasa versátil) (Ward *et al.*, 2004). El sistema enzimático de *Inonotus rickii* no se ha estudiado en detalle hasta el momento.

En ambos tratamientos, los radios permanecieron en apariencia inalterados. Los hongos crecieron centrípetamente a través de los radios y axialmente por el lumen de elementos de vasos y fibras. Esto apoya la hipótesis que el sistema radial actúa como un camino efectivo y rápido para la colonización y acceso al sistema axial. Schwarze & Fink (1997) observaron que los radios del plátano (*P. acerifolia*) eran resistentes a la degradación por parte de *Inonotus hispidus* y sugirieron que estos podía estar asociado a la formación de depósitos polifenólicos en el lumen de las células o dentro de los espacios intercelulares entre células de radios adyacentes. En el presente estudio *in vitro*, sin embargo, no fue posible detectar esto depósitos. En general, las hifas fueron observadas en el lumen celular creciendo en contacto a la superficie interna de las paredes celulares y colonizando diferentes células a través de las puntuaciones. Esta es la forma más frecuente de colonización fúngica de la madera (Schwarze, 2007).

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos histoquímicos fueron consistentes con las observaciones de MO, MEB y MET. Los cambios de birrefringencia producidos por *B. adusta* indican desorganización de la celulosa, debido a que fue afectada la estructura molecular de la celulosa o la disposición de las microfibrillas. Esto es consistente con una degradación de tipo de simultánea.

Las clamidosporas son esporas de resistencia de pared gruesa que pueden sobrevivir condiciones ambientales desfavorables. *I. rickii* las produce tanto en su basidioma como en cultivo (Wright & Iaconis, 1955). La presencia de clamidosporas observadas en la madera inoculada con esta especie sugiere que este hongo posee un alto potencial de producción de inóculo y capacidad de colonización de nuevos hospedantes. Debido a este hecho, debería considerarse a *I. rickii* una especie xilófaga de importancia a considerar, aún cuando no cause una alta pérdida de peso en la madera

en los primeros estadios de degradación (Robles *et al.*, 2011). *Bjerkandera adusta*, por el otro lado, no produjo propágulos en la madera, como suele hacerlo usualmente en cultivo en forma de artrosporas (Stalpers, 1978), sugiriendo una menor capacidad de dispersión que *I. rickii*.

En relación al patrón de degradación, existen estudios contradictorios respecto al tipo de degradación producida por *B. adusta*. Blanchette (1984) observó que esta especie provocaba una delignificación selectiva en *B. papyrifera* Marsch (abedul papirífero o de las canos), removiendo selectivamente la laminilla media de las fibras. Esto fue corroborado en el mismo estudio por análisis químicos de porcentaje de lignina, celulosa, manosa y xilosa. Anagnost (1998) reportó que *B. adusta* causaba una pudrición de tipo simultánea en el abedul amarillo (*Betula alleghaniensis* Britton), produciendo una erosión del lumen y de las puntuaciones. Nuestros resultados en relación al patrón de pudrición de *B. adusta* son más similares a las observaciones realizadas por Anagnost (1998).

Por otro lado existen numerosos reportes de especies de *Inonotus* causando una delignificación selectiva en la madera: *Inonotus dryophilus* y *Inonotus ludovicianus* en *Quercus*, *Inonotus rheades* en *Populus* sp., *Inonotus texanus* en *Prosopis* sp., *Inonotus tomentosus* en *Picea glauca* (Otjen & Blanchette, 1982; Blanchette, 1984) y *I. hispidus* en fresno (*Fraxinus excelsior* L.) (Schwarze *et al.*, 1995). Es interesante mencionar que esta última especie puede producir además cavidades del tipo de pudrición blanda tanto en fresno como en plátano híbrido (*P. acerifolia*) (Schwarze *et al.*, 1995). Se ha citado asimismo a *I. hispidus* causando degradación simultánea (Schubert *et al.*, 2008).

Este es el primer estudio extensivo y comparativo de las características micro y ultraestructurales de la degradación producida por estos agentes xilófagos. Aunque los ensayos *in vitro* no pueden considerarse como una evidencia absoluta del comportamiento de estos hongos en ecosistemas naturales, son una herramienta útil para analizar sus patrones de degradación de madera. En estadios tempranos de degradación, *B. adusta* alteraría principalmente la resistencia y rigidez de la madera mientras que *I. rickii* afectaría la conductividad del xilema. El conocimiento de estas características estructurales podría ayudar a definir el nivel de riesgo en estadios tempranos y optimizar las decisiones asociadas al manejo de arbolado urbano para cada caso.

8. Consideraciones finales

El presente trabajo presenta evidencia de los endofitos de madera como potenciales degradadores de madera en el ecosistema urbano. La producción de oxidasas y la pérdida de peso en la madera por parte de endofitos fúngicos, junto con la asociación entre cepas endofíticas y patógenas al realizar estudios filogenéticos en más de una región génica, apoyan la “hipótesis de la infección latente”, la cual indica que existiría una colonización por parte de hongos patógenos o potencialmente patógenos, en xilema aparentemente sano. Este concepto fue propuesto inicialmente por Boddy & Rayner (1983) y apoyado por diversos autores, como Baum *et al.* (2003), Oses *et al.* (2008) y Parfitt *et al.* (2010).

Este estudio constituye el primer relevamiento sistemático de endofitos de madera en arboles urbanos, con especial interés en la relación entre su abundancia e identidad, presencia e identidad de basidiomicetes patógenos y factores ambientales como la edad del árbol (en base al DAP) y el nivel de disturbio antrópico. Nuestros resultados sugieren que, para el sistema estudiado en este ambiente urbano, la composición de la micobiota endofítica de madera de *P. acerifolia* se encuentra afectada principalmente por el sitio de muestreo, con sus características asociadas, tal como el nivel de disturbio antrópico. Otras variables, como la edad de los árboles y la presencia de basidiomicetes patógenos, la afectan en menor grado. Sin embargo, se observó una relación positiva entre la riqueza estimada de endofitos y la edad de los arboles asintomáticos. Finalmente, se encontró una relación positiva entre la presencia de basidiomicetes patógenos y la de basidiomicetes endofíticos, sugiriendo la importancia de la fuente de inóculo en la colonización de árboles asintomáticos.



Conclusiones

- ❖ Se describe por primera vez una comunidad endofítica de madera en un ambiente urbano.
- ❖ Existe una colonización en plátanos asintomáticos por parte de basidiomicetes y Xylariales potencialmente patógenos, los cuales se encontrarían en una fase de latencia, ya que producen oxidasas, pérdida significativa en el peso de la madera de plátano y se asocian filogenéticamente con cepas patogénicas de los mismos taxones (*Inonotus rickii* y *Nodulisporium* sp.).
- ❖ La composición de la comunidad endofítica de madera de *Platanus acerifolia* se encuentra afectada principalmente por los sitios de muestreos, los cuales presentan diferentes niveles de disturbio antrópico.
- ❖ Los árboles asintomáticos de mayor edad poseerían una mayor riqueza de endofitos.
- ❖ Existe una relación positiva entre la colonización de árboles sintomáticos y arboles asintomáticos por parte de basidiomicetes.
- ❖ Existen micromicetes de la superficie de la madera de *P. acerifolia*, como *Trichoderma harzianum*, capaces de inhibir el crecimiento de hongos de pudrición comunes en el arbolado de la Ciudad de Buenos Aires sobre este hospedante, como también cepas endofíticas, como *Granulobasidium vellereum* (Basidiomycota) y *T. harzianum*
- ❖ *Granulobasidium vellereum* es el primer caso para nuestro país de un basidiomicete evaluado como posible biocontrolador de hongos xilófagos
- ❖ *Bjerkandera adusta* e *Inonotus rickii*, los dos agentes xilófagos más importantes en el arbolado urbano de la Ciudad de Buenos Aires, deberían ser tenidos en cuenta en los monitoreos para el manejo y gestión del arbolado urbano.

Como se ha discutido previamente son varias las ventajas de que el arbolado urbano se encuentre en buenas condiciones fitosanitarias, asimismo no son pocos los perjuicios derivados del biodeterioro de los ejemplares que constituyen este ecosistema urbano.

En la presente tesis se han desarrollado herramientas de interés para la implementación de protocolos de monitoreo del arbolado urbano y que pueden contribuir a la prevención del biodeterioro de los ejemplares y a la toma de decisiones en relación al reemplazo temprano y preventivo de los mismos. El estudio de las comunidades endofíticas, que incluyan la detección selectiva de especies claves como *Inonotus rickii*, *Phanerochaete chrysosporium* o especies de *Nodulisporium*, y en particular en aquellos árboles mayores a los 50 años de edad, brindarían información valiosa para la identificación de potenciales problemas de sanidad en la madera prediciendo así el riesgo de biodeterioro de la misma. En este contexto este trabajo señala la importancia de contar con bases de datos de secuencias genómicas regionales que permitan una rápida y precisa identificación de organismos claves para el manejo del arbolado.



Perspectivas

La información obtenida en esta tesis amplía el conocimiento biológico de la identidad y acción de los hongos xilófagos del arbolado urbano y contribuye al conocimiento de los endofitos fúngicos de madera. A continuación se proponen algunos estudios complementarios que permitirían extender y completar los resultados obtenidos en este trabajo:

- ❖ Ampliar la información sobre secuencias de ADN de agentes xilófagos y endofitos fúngicos regionales, directamente a partir de muestras de madera, utilizando técnicas de cultivo y de pirosecuenciación.
- ❖ Utilizar la información obtenida por las técnicas de pirosecuenciación para comprender mejor la composición de las comunidades endofíticas, saprofíticas y patógenas de la madera de árboles urbanos.
- ❖ Analizar la capacidad biocontroladora de micromicetes endofíticos y saprofíticos del arbolado urbano sobre cepas xilófagas en ensayos *in vitro* sobre sustratos más representativos del sustrato natural, como ramas o porciones de fustes.
- ❖ Investigar la presencia de una competencia por recursos o la inhibición del crecimiento por metabolitos secundarios, para las combinaciones xilófagos – antagonistas estudiadas en este trabajo.
- ❖ Extender el análisis de patrones de degradación producidos por otras especies xilófagas con alto poder degradador a través de microscopía óptica y electrónica.
- ❖ Realizar un seguimiento de los árboles identificados como portadores de hongos causantes de biodeterioro para monitorear el comportamiento de estas comunidades asintomáticas a largo plazo.



Bibliografía

- Adair S, Kim SH & Breuil C** (2002). A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. *FEMS Microbiology Letters*. 211 (1): 117–122.
- Adaskaveg JE, Gilbertson RL & Blanchette RA** (1990). Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (6): 1932–1943.
- Allegrucci N, Cabello MN & Arambarri AM** (2009). Diversity of saprotrophic anamorphic ascomycetes from native forests in Argentina: an updated review. *Darwiniana*. 47 (1): 108–124.
- Anagnost SE** (1998). Light microscopy diagnosis of wood decay. *IAWA Journal*. 19 (2): 141–167.
- Annesi T, Coppola R & Motta E** (2003). Decay and canker caused by *Inonotus rickii* spreading on more urban tree species. *Forest Pathology*. 33 (6): 405–412.
- Arhipova N, Gaitnieks T, Donis J, Stenlid J & Vasaitis R** (2011). Decay, yield loss and associated fungi in stands of grey alder (*Alnus incana*) in Latvia. *Forestry*. 84 (4): 337–348.
- Arnold AE** (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 21 (2–3): 51–66.
- Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N & Herre EA** (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (26): 15649–15654.
- Bahnweg G, Moller EM, Anegg S, Langebartels C, Wienhaus O & Sandermann Jr H** (2002). Detection of *Heterobasidion annosum* s. l. [(Fr.) Bref.] in Norway spruce by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*. 150 (7): 382–389.
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Crozier J, Thomas SE, Samuels GJ, Vinyard BT & Holmes KA** (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 46 (1): 24–35.
- Bakys R, Vasaitis R, Barklund P, Thomsen IM & Stenlid J** (2009). Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *European Journal of Forest Research*. 128 (1): 51–60.
- Barengo N, Sieber TN & Holdenrieder O** (2000). Diversity of endophytic mycobiota in leaves and twigs of pubescent birch (*Betula pubescens*). *Sydowia*. 52 (2): 305–320.
- Baum S, Sieber TN, Schwarze FWMR & Fink S** (2003). Latent infections of *Fomes fomentarius* in the xylem of European beech (*Fagus sylvatica*). *Mycological Progress*. 2 (2): 141–148.
- Bernicchia A, Venturella G, Saitta A & Pérez Gorjón S** (2007). Aphyllophoraceous wood-inhabiting fungi on *Fagus sylvatica* in Italy. *Mycotaxon*. 101: 229–232.

- Bertoni MD & Cabral D** (1988). Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*. II: Distribution of endophytes. *Nova Hedwigia*. 46 (3–4): 491–502.
- Bettucci L, Alonso R & Tiscornia S** (1999). Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. *Mycological Research*. 103 (4): 468–472.
- Bezerra JDP, Santos MGS, Svedese VM, Lima DMM, Fernandes MJS, Paiva LM & Souza-Motta CM** (2012). Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28 (5): 1989–1995.
- Bianchinotti V & Lopez SE** (1999). *Trichoderma harzianum* como posible biocontrolador de Basidiomycetes xilófagos de árboles urbanos. III Congreso Latinoamericano de Micología, Caracas, Venezuela.
- Bitzer J, Laessle T, Fournier J, Kummer V, Decock C, Tichy HV, Piepenbring M, Persoh D & Stadler M** (2008). Affinities of *Phylacia* and the daldinoid Xylariaceae, inferred from chemotypes of cultures and ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*. 112 (2): 251–270.
- Blanchette RA** (1984). Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (3): 647–653.
- Blanchette RA, Nilsson T, Daniel D & Abad A** (1990). Biological degradation of wood. En: *Archaeological Wood: Properties, Chemistry, and Preservation*. Rowell RM & Barbour RJ (Eds.). *Advances in Chemistry Series* 225, American Chemical Society, Washington DC. Pp: 141–174.
- Blanchette RA, Burnes TA, Eerdmans MM & Akhtar M** (1992). Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. *Holzforschung*. 46 (2): 109–116.
- Blanchette R A, Obst J R, Hedges J I & Weliky K** (1987). Resistance of hardwood vessels to degradation by white rot basidiomycetes. *Canadian Journal of Botany*. 66 (9): 1841–1847.
- Boddy L & Rayner ADM** (1983). Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytologist*. 94 (4): 623–641.
- Boidin J** (1951). Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycètes en culture pure. *Revue de Mycology*. 16: 173–197.
- Bolund P & Hunhammar S** (1999). Ecosystem services in urban areas. *Ecological Economics*. 29 (2): 293–301.
- Bonduel C, Santos P, Turienzo CF, Chantada G & Paganini H** (2001). Atypical skin lesions caused by *Curvularia* sp. and *Pseudallescheria boydii* in two patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*. 27(12):1311–1313.

- Booth C** (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. 237 pp.
- Brown HL & Bruce A** (1999). Assessment of the biocontrol potential of a *Trichoderma viride* isolate. Part I: Establishment of field and fungal cellar trials. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 44 (4): 219–223.
- Bruce A & Highley TL** (1991). Control of growth of wood decay Basidiomycetes by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi. *Forest Products Journal*. 41 (2): 63–67.
- Bruce A, Wheatley RE, Humphris SN, Hackett CA & Florence MEJ** (2005). Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzforschung*. 54 (5): 481–486.
- Buck JW & Traquair JA** (1998). Influence of iron depletion on interactions between peach bark fungi in vitro. *Mycologia*. 90 (6): 947–953.
- Buenos Aires frente al cambio climático** (2011). Agencia de Protección Ambiental. Ministerio de Ambiente y Espacio Público. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 72 pp. Disponible en: www.buenosaires.gov.ar. Último acceso el 12 de septiembre de 2013.
- Burdsall Jr HH & Eslyn WE** (1974). A new *Phanerochaete* with a *Chrysosporium* imperfect state. *Mycotaxon*. 1 (2): 123–133.
- Cabral D** (1985). Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*: dynamics of fungal populations. *Transactions of the British Mycological Society*. 85 (3): 501–511.
- Calviello BO** (1972). Estudio de las especies argentinas del género “*Chaetomium*” Kunze Ex Fries (Chaetomiaceae) III. *Comunicaciones del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”*. 2 (6): 27–32.
- Capdet M** (2012). Biodiversidad de Ascomycetes sexuales y asexuales xilófilos sobre palmeras nativas en la República Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Carmichael JW, Kendrick WB, Connors IL & Sigler L** (1980). Genera of Hyphomycetes. University of Alberta Press, Edmonton, Alberta, Canada. 386 pp.
- Carroll G** (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*. 69 (1): 2–9.
- Chagas-Neto TC, Chaves GM & Colombo AL** (2008). Update on the Genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*. 166 (3): 121–132.
- Chaverri P, Gazis RO & Samuels GJ** (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*. 103 (1): 139–151.
- Christ S, Wubet T, Theuerl S, Herold N & Buscot F** (2011). Fungal communities in bulk soil and stone compartments of different forest and soil types as revealed by a barcoding ITS

- rDNA and a functional laccase encoding gene marker. *Soil Biology & Biochemistry*. 43 (6): 1292–1299.
- Cifuentes J, Petersen RH & Hughes K** (2003). *Campanophyllum*: A new genus for an old species name. *Mycological Progress*. 2 (4): 285–295.
- Collado J, Platas G, González I & Peláez F** (1999). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist*. 144 (3): 525–532.
- Colwell RK** (2006). EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>.
- Cook RJ & Baker KF** (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS PRESS, The American Phytopathology Society. 539 pp.
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YV, Zaoutis T, Kottitil S & Walsh TJ** (2008). Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 21 (1): 157–197.
- Cozzo D** (1942). El arbolado de las calles de la ciudad de Buenos Aires. *Revista Argentina de Agronomía*. 9 (4): 354–376.
- Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V & Stegehuis G** (2004). MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*. 50: 19–22
- Crozier J, Thomas SE, Aime MC, Evans HC & Holmes KA** (2006). Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*. 55 (6): 783–91.
- D'Ambrogio de Argüeso A** (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 86 pp.
- Dai Y-C, Cui BK, Yuan HS & Li BD** (2007). Pathogenic wood-decaying fungi in China. *Forest Pathology*. 37 (2): 105–120.
- Dai Y-C, D'Amico L, Motta E & Annesi T** (2010). First report of *Inonotus rickii* causing canker and decay on *Hevea brasiliensis* in China. *Plant Pathology*. 59 (4): 806–806.
- Dai Y-C, Vainio EJ, Hantula J, Niemelä T & Korhonen K** (2003). Investigations on *Heterobasidion annosum* s.lat. in central and eastern Asia with the aid of mating tests and DNA fingerprinting. *Forest Pathology*. 33 (5): 269–286.
- Davidson RW, Campbell WA & Blaisdell DJ** (1938). Differentiation of wood- decaying fungi by their reactions on Gallic or Tannic acid medium. *Journal of Agricultural Research*. 57 (9): 683–695.
- Davidson RW, Campbell WA & Vaughn DB** (1942). Fungi causing decay of living oaks in the Eastern United States and their cultural identification. Technical Bulletin 785, United States Department of Agriculture. Washington D. C. 65 pp.

- de Errasti A, Carmarán CC & Novas MV** (2010). Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity*. 41 (1): 29–40.
- de Koker TH, Nakasone KK, Haarhof J, Burdsall HH Jr & Janse BJ** (2003). Phylogenetic relationships of the genus *Phanerochaete* inferred from the internal transcribed spacer region. *Mycological Research*. 107 (9): 1032–1040.
- De Simone D, D'Amico L, Bressanin D, Motta E & Annesi T** (2011). Molecular characterization of *Inonotus rickii* /*Ptychogaster cubensis* isolates from different geographic provenances. *Mycological Progress*. 10 (3): 301–306.
- Deschamps JR & Wright JE** (1975). Clave para el reconocimiento en cultivo de las especies xilófagas de *Basidiomycetes argentinae*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA*. Serie V, Patología Vegetal. 12 (2): 77–87.
- Domsch KH, Gams W & Anderson TH** (2007). Compendium of soil fungi, 2nd Edition. IHW-Verlag, Eching, Alemania. 672 pp.
- Durán EL, Ploper LD, Ramallo JC, Picollo Grandi RA, Hupper Giancoli AC & Azevedo JL** (2005). The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. *Canadian Journal of Botany*. 83 (4): 350–355.
- Eilenberg J, Hajek A & Lomer C** (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biological Control*. 46 (4): 387–400.
- Ellis MB** (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, Inglaterra. 608 pp.
- Esquivel P, Mangiaterra M, Giusiano G & Sosa MA** (2003). Microhongos anemófilos en ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. *Boletín Micológico*. 18: 21–28.
- Evans HC, Holmes KA & Thomas SE** (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*. 2 (2): 149–160.
- Evert RF** (2006). Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development, 3rd Edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 624 pp.
- Farr DF, Bills GF, Chamuris GP & Rossman AY** (1989). Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press Minnesota, EE.UU. 1252 pp.
- Fischer M & Wagner T** (1999). RFLP analysis as a tool for identification of lignicolous basidiomycetes: European polypores. *European Journal of Forest Pathology*. 29 (4): 295–304.

- Fisher PJ, Petrini O, Petrini LE & Sutton BC** (1994). Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist*. 127 (1): 133–137.
- France A, Santelices C, Buddie A & Kirk P** (2009). Silver leaf: first worldwide report of a new and harmful disease on blueberry. *IX International Vaccinium Symposium*. 810: 341–344.
- Fröhlich-Nowoisky J, Pickersgill DA, Després VR & Pöschl U** (2009). High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*. 106 (31): 12814–12819.
- Fukami T, Dickie IA, Wilkie J P, Paulus BC, Park D, Roberts A, Buchanan PK & Allen RB** (2010). Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecology Letters*. 13 (6): 675–684.
- Gams W & Bissett J** (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Volumen I. Taylor y Francis, Londres, Inglaterra. 34 pp.
- Gams W & McGinnis MR** (1983). *Phialemonium*, a new anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia*. 75 (6): 977–987.
- Gazis R & Chaverri P** (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*. 3 (3): 240–254.
- Gehlot P, Bohra NK & Purohit DK** (2008). Endophytic mycoflora of inner bark of *Prosopis cineraria* - a key stone tree species of Indian Desert. *American-Eurasian Journal of Botany*. 1 (1): 1–4.
- Geldenhuis MM, Roux J, Montenegro F, De Beer ZW, Wingfield MJ & Wingfield BD** (2004). Identification and pathogenicity of *Graphium* and *Pesotum* species from machete wounds on *Schizolobium parahybum* in Ecuador. *Fungal Diversity*. 15: 137–151.
- Gerhold HD** (2007). Origins of Urban Forestry. En: *Urban and Community Forestry in the Northeast*, 2nd Edition. Kuser JE (Ed.). Springer, Dordrecht, Países Bajos. Pp. 1–23.
- Giordano L, Gonthier P, Varese GC, Miserere L & Nicolotti G** (2009). Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*. 38: 69–83.
- Glass NL & Donaldson GC** (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (4): 1323–1330.
- Goloboff P** (1997). NONA, version 2.0 for Windows. Disponible en: <http://www.cladistics.com/>. Último acceso el 12 de septiembre de 2013.
- Gonthier P, Garbelotto M & Nicolotti G** (2003). Swiss stone pine trees and spruce stumps represent an important habitat for *Heterobasidion* spp. in subalpine forests. *Forest Pathology*. 33 (3): 191–203.

- González HHL, Molto GA, Pacin A, Resnik SL, Zelaya MJ, Masana M & Martínez EJ** (2008). Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires Province, Argentina. *Mycopathologia*. 165 (2): 105–114.
- González G & Tello ML** (2010). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*. 47: 29–42.
- Gottlieb AM, Wright JE & Moncalvo J** (2002). *Inonotus* s.l. in Argentina—morphology, cultural characters and molecular analyses. *Mycological Progress*. 1 (3): 299–313.
- Gottlieb AM, Ferrer E & Wright JE** (2000). rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*. *Mycological Research*. 104 (9): 1033–1045.
- Götz M, Nirenberg H, Krause S, Wolters H, Draeger S, Buchner A, Lottmann J, Berg G & Smalla K** (2006). Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*. 58 (3): 404–413.
- Greenhalgh GN & Chesters CGC** (1968). Conidiophore morphology in some british members of the xylariaceae. *Transactions of British Mycological Society*. 51(1): 57–82.
- Greslebin AG & Rajchenberg M** (2003). Diversity of Corticiaceae sens. lat. in Patagonia, Southern Argentina. *New Zealand Journal of Botany*. 41 (1):437–446.
- Griffith GS & Boody L** (1990). Fungal decomposition of attached angiosperm twigs I. Decay community development in ash, beech and oak. *New Phytologist*. 116 (3): 407–415.
- Grimm GW & Denk T** (2008). ITS Evolution in *Platanus* (Platanaceae): homoeologues, pseudogenes and ancient hybridization. *Annals of Botany*. 101 (3): 403–419.
- Grundy KC, Woodward S, Genney DR & Taylor AF** (2012). A molecular approach to explore the extent of the threatened fungus *Hypocreopsis rhododendri* within wood. *Fungal Biology*. 116 (3): 354–362.
- Guarro J, Gené J, De Vroey C & Guého E** (1992). *Hormographiella*, a new genus of hyphomycetes from clinical sources. *Mycotaxon*. 45: 179–190.
- Guglielmo F, Bergemann SE, Gonthier P, Nicolotti G & Garbelotto M** (2007). A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (5): 1490–1507.
- Guglielmo F, Gonthier P, Garbelotto M & Nicolotti G** (2008). A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* s.l. and *Phellinus* s.l. *FEMS Microbiology Letters*. 282 (2): 228–237.
- Guo L-D, Huang G-R & Wang Y** (2008). Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50 (8): 997–1003.

- Guo L-D, Xu L, Zheng WH & Hyde KD** (2004). Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). *Fungal Diversity*. 16: 53–65.
- Hakala TK, Maijala P, Konn J & Hatakka A** (2004). Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. *Enzyme and Microbial Technology*. 34 (3): 255–263.
- Hall TA** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95–98.
- Hamelin R C, Germain H, Laflamme G & Bernier L** (2002). DNA polymorphism and molecular diagnosis in *Inonotus* spp. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24 (2): 194–199.
- He S-H & Dai Y-C** (2012). Taxonomy and phylogeny of Hymenochaete and allied genera of Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity*. 56 (1): 77–93.
- Heizkill M, Bech L, Halkier O, Schneider P & Anke T** (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (5): 1601–1606.
- Hendry SJ, Boddy L & Lonsdale D** (2002). Abiotic variables effect differential expression of latent infections in beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist*. 155 (3): 449–460.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P & Nilsson RH** (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*. 25 (1): 38–47.
- Highley TL** (1990). Laboratory studies on antagonism of *Scytalidium lignicola* to wood decay fungi. *Material und Organismen*. 25 (3): 181–192.
- Highley TL & Ricard J** (1988). Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against wood decay fungi. *Material und Organismen*. 23 (3): 157–169.
- Ho MH-M, Castaneda RF, Dugan FM & Jong SC** (1999). *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and an expanded key. *Mycotaxon*. 72: 115–157.
- Hoegger PJ, Navarro-González M, Kilaru S, Hoffmann M, Westbrook ED & Kües U** (2004). The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Current Genetics*. 45 (1): 9–18.
- Hoff JA, Klopfenstein NB, McDonald GI, Tonn JR., Kim MS, Zambino PJ, Hessburg PF, Rogers JD, Peever TL & Carris LM** (2004). Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology*. 34 (4): 255–271.
- Holmer L & Stenlid J** (1997). *Resinicium bicolor*: a potential control agent for *Heterobasidion annosum*. *European Journal of Forest Pathology*. 27 (3): 159–172.

- Hormazabal E & Piontelli E** (2009). Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (5): 813–819.
- Hsieh HM, Ju YM & Rogers JD** (2005). Molecular phylogeny of *Hypoxyton* and closely related genera. *Mycologia*. 97 (4): 844–865.
- Hsieh HM, Lin CR, Fang MJ, Rogers JD, Fournier J, Lechat C & Ju YM** (2010). Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily Xylarioideae (Xylariaceae) and phylogeny of the taxa involved in the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54 (3): 957–969.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H & Sun M** (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*. 33: 61–75.
- Hultman JM, Pitkaranta M, Romantschuk M, Auvinen P & Paulin L** (2008a). Probe-based negative selection for underrepresented phylotypes in large environmental clone libraries. *Journal of Microbiological Methods*. 75 (3): 457–463.
- Hultman JM, Ritari J, Romantschuk M, Paulin L & Auvinen P** (2008b). Universal ligation-detection-reaction microarray applied for compost microbes. *BMC Microbiology*. 8 (1): 237.
- Hultman JM, Vasara T, Partanen P, Kurola J, Kontro MH, Paulin L, Auvinen P & Romantschuk M** (2010). Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (2): 472–487.
- Hyde KD & Soyong K** (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*. 33: 163–173.
- Iannone LJ & Cabral D** (2006). Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. *Symbiosis*. 41 (2): 61–69.
- Iannone LJ, White JF, Giussani LM, Cabral D & Novas MV** (2011). Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological Progress*. 10 (1): 9–19.
- INDEC** (2011). Censo de Argentina. Disponible en: <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>. Último acceso el 14 de enero de 2014.
- Intini M & Tello ML** (2003). Comunicación Investigaciones sobre hongos xilófagos de árboles urbanos en Europa: primera cita de *Inonotus rickii* (Pat.) Reid en España. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*. 29 (2): 277–279.
- Isaeva AM, Glushakova SA, Garbuz AV, Kachalkin I & Chernov Y** (2010). Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology Bulletin*. 37 (1): 26–34.

- James TY, Lee M & van Diepen LTA** (2011). A single mating-type locus composed of homeodomain genes promotes nuclear migration and heterokaryosis in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eukaryotic cell*. 10 (2): 249–261.
- Jasalavich CA, Ostrofsky A & Jellison J** (2000). Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (11): 4725–4734.
- Jayasinghe BAT & Parkinson D** (2008). Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied soil ecology*. 38 (2): 109–118.
- Jellison J & Goodell B** (1988). Immunological detection of decay in wood. *Wood Science and Technology*. 22 (4): 293–297.
- Jeong WJ, Lim YW, Lee JS & Jung HS** (2005). Phylogeny of *Phellinus* and related genera inferred from combined data of ITS and mitochondrial SSU rDNA sequences. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15 (5): 1028–1038.
- Job DJ & Wright JE** (1986). Experimental wood-rot of *Salix humboldtiana* blocks by species of Hymenochaete (Aphylllophorales). *Material und Organismen*. 21 (4):301–310.
- Johannesson H, Laessoe T & Stenlid J** (2000). Molecular and morphological investigation of *Daldinia* in northern Europe. *Mycological Research*. 104 (3): 275–280.
- Kamei I, Suhara H & Kondo R** (2005). Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69 (3): 358–366.
- Kane B** (2005). Value, benefits and cost of urban trees. *Virginia Cooperative Extension, Publication* 420–181.
- Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P, Piaphukiew J, Whalley AJ, Reynolds CD & Sihanonth P** (2007). Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiology Letters*. 270 (1): 162–170.
- Keirle MR, Hemmes DE & Desjardin DE** (2004). Agaricales of the Hawaiian Islands. 8. Agaricaceae: *Coprinus* and *Podaxis*; Psathyrellaceae: *Coprinopsis*, *Coprinellus* and *Parasola*. *Fungal Diversity*. 15: 33–124.
- Kim M-S, Klopfenstein NB, Hanna JW & McDonald GI** (2006). Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology*. 36: 145–164.
- Klein D & Eveleigh DE** (1998). Ecology of *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Volumen I. (eds Kubicek CP & Harman GE). Taylor y Francis, Londres, Inglaterra. pp 57–74.
- Klich MA** (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos. 116 pp.

- Kowalski T & Gajosek M** (1998). Endophytic mycobiota in stems and branches of *Betula pendula* to a different degree affected by air pollution. *Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde*. 7: 13–24.
- Kües U** (2000). Life history and developmental processes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (2): 316–353.
- Kumaresan V & Suryanarayanan TS** (2001). Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*. 105 (11): 1388–1391.
- Lahitte HB & Huriel JA** (1999). Árboles Urbanos. Los árboles cultivados más comunes de la Región Rioplatense. (Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense). L.O.L.A. Colección Biota rioplatense, Vol. IV. 320 pp.
- Larran S, Perelló A, Simón MR & Moreno M** (2007). The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23 (4): 565–572.
- Lee J, Huh N, Hong JH, Kim BS, Kim G-H & Kim J-J** (2012). The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. *Holzforschung*. 66: 883–887.
- Lee JS, Ko KS & Jung HS** (2000). Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 187 (1): 89–93.
- Leonardis RF, Mangieri HR, Tinto JC, Alonzo A & Reutes HR** (2000). El nuevo libro del árbol: Tomo III. Especies exóticas de uso ornamental. El Ateneo, Buenos Aires. 121 pp.
- Levin L & Castro MA** (1998). Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes trogii* (Aphyllophorales) in wood of *Salix* and *Populus*. *IAWA Journal*. 19 (2): 169–180.
- Levin L, Papinutti L & Forchiassin F** (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*. 94 (2): 169–176.
- Lesage-Meesen L, Haon M, Uzan E, Levasseur A, Piumi F, Navarro D, Taussac S, Favel A & Lomascolo A** (2011). Phylogeographic relationships in the polypore fungus *Pycnoporus* inferred from molecular data. *FEMS Microbiology Letters*. 325 (1): 37–48.
- Liébecq C** (1992). Biochemical Nomenclature and Related Documents- A Compendium, 2nd Edition. Portland Press en nombre de IUBMB, Londres, Inglaterra.
- Lim YW, Keun SB, Chun J, Kang HL, Won JJ & Kyung SB** (2007). Accurate delimitation of *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete sordida* by specific PCR primers and cultural approach. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17 (3): 468–473.
- Linsen L, Karis BJ, McPherson G & Hamann B** (2005). Tree Growth Visualization. *Journal of WSCG*. 13 (3): 81–88.

- Liu G, Li Z & Bao M** (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*. 157 (1–2): 145–154.
- Lopez SE & Wright JE** (1985). A new species of *Hypochnicium* (Corticaceae) from Argentina. *Mycotaxon*. 23: 439–443.
- Lucero M, Barrowa JR, Osunab P & Reyes I** (2008). A cryptic microbial community persists within micropropagated *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr. cultures. *Plant Science*. 174 (6): 570–575.
- Luna ML, Murace MA, Keil GD & Otaño ME** (2004). Patterns of decay caused by *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma lucidum* (Aphyllophorales) in poplar wood. *IAWA Journal*. 25 (4): 425–433.
- Lupo S, Tiscornia S & Bettucci L** (2001). Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18 (1): 38–41.
- Lygis V, Vasiliauskas R, Larsson KH & Stenlid J** (2005). Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 20 (4): 337–346.
- Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Abdullah SK, Descals E, Salinas J & Lopez-Llorca LV** (2008). Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*. 64 (1): 90–105.
- Maco SE & McPherson EG** (2003). A practical approach to assessing structure, function, and value of street tree populations in small communities. *Journal of Arboriculture*. 29 (2): 84–97.
- Maddison WP & Maddison DR** (2011). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Disponible en: <http://mesquiteproject.org>. Último acceso el 12 de septiembre de 2013.
- Magnoli C, Dalcero AM, Chiacchiera SM, Miazzi R & Saenz MA** (1998). Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*. 142 (1): 27–32.
- Maharachchikumbura SS, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH & Hyde KD** (2011). *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*. 50 (1): 167–187.
- Mahesh B, Tejesvi MV, Nalini MS, Prakash HS, Kini KR, Subbiah V & Shetty HS** (2005). Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Current Science*. 88 (2): 218–219.
- Mangiaterra M, Giusiano G & González I** (2006). Algunos microhongos geofílicos de las planicies semiáridas del noroeste de la provincia de San Luis (Argentina). *Boletín Micológico*. 21: 43–48.

- Marcomini SC & López RA** (2004). Generación de nuevos ecosistemas litorales por albardones de relleno en la costa de la ciudad de Buenos Aires. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*. 59 (2): 261–272.
- Mattheck C & Breloer H** (1994). Field guide for visual tree assessment (VTA). *Arboricultural Journal*. 18 (1): 1–23.
- Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo J-M, Ge Z-W, Yang Z-L, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ, Bougher NL, Hughes KW, Lodge DJ, Kerrigan RW, Seidl MT, Aanen DK, DeNitis M, Daniele GM, Desjardin DE, Kropp BR, Norvell LL, Parker A, Vellinga EC, Vilgalys R & Hibbett DS** (2006). Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia*. 98 (6): 982–995.
- Matheny PB, Wang Z, Binder M, Curtis JM, Lim YW, Nilsson RH, Hughes K W, Hofstetter V, Ammirati JF, Schoch CL, Langer H, Langer G, McLaughlin DJ, Wilson AW, Frøslev T, Ge Z-W, Kerrigan RW, Slot JC, Yang Z-L, Baroni TJ, Fischer M, Hosaka K, Matsuura K, Seidl MT, Vauras J & Hibbett DS** (2007). Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular and Phylogenetics Evolution*. 43 (2): 430–451.
- Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Bael SV, Arnold AE, Hebbbar P, Samuels GJ, Robbins N & Herre EA** (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*. 46 (1): 4–14.
- Melo I, Ramos P & Caetano MFF** (2002). First record of *Inonotus rickii* (Basidiomycetes, Hymenochaetaceae) in Portugal. *Portugaliae Acta Biologica*. 20: 265–269.
- Mielnichuk N & Lopez SE** (2007). Interaction between *Epicoccum purpurascens* and xylophagous basidiomycetes on wood blocks. *Forest Pathology*. 37 (4): 236–242.
- Miettinen O, Larsson E, Sjökvist E & Larsson KH** (2012). Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Polyporales, Basidiomycota). *Cladistics*. 28 (3): 251–270.
- Monte E** (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*. 4: 1–4.
- Morgan-Jones G & Burch KB** (1988). Studies in the genus *Phoma*. X: concerning *Phoma eupyrena*, an ubiquitous, soil-borne species. *Mycotaxon*. 31 (2): 427–434.
- Murali TS, Suryanarayanan TS & Geeta R** (2006). Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology*. 52 (7): 673–680.
- Nagy LG, Urban A, Orstadius L, Papp T, Larsson E & Vagvolgyi C** (2010). The evolution of autodigestion in the mushroom family Psathyrellaceae (Agaricales) inferred from Maximum Likelihood and Bayesian methods. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57 (3): 1037–1048.

- Nagy LG, Walther G, Hazi J, Vagvolgyi C & Papp T (2011). Understanding the evolutionary processes of fungal fruiting bodies: correlated evolution and divergence times in the psathyrellaceae. *Systematic Biology*. 60 (3): 303–317.
- Nakasone KK (1990). Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America. *Mycologia Memoir*. 15: 1–412.
- Naumann A, Navarro-Gonzalez M, Sanchez-Hernandez O, Hoegger PJ & Kües U (2007). Correct identification of wood-inhabiting fungi by ITS analysis. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 1 (1): 41–61.
- Navia M, Romero HM, Rodríguez J, Vélez DC & Martínez G (2010). Molecular identification of microorganisms associated with oil palm bud rot disease. *Caribbean Division Meeting Abstracts. Phytopathology*. 101(6): S253.
- Nicolotti G, Gonthier P, Guglielmo F & Garbelotto MM (2009). A biomolecular method for the detection of wood decay fungi: a focus on tree stability assessment. *Arboriculture & Urban Forestry*. 35 (1): 14–19.
- Nilsson T & Daniel G (1989). Chemistry and microscopy of wood decay by some higher Ascomycetes. *Holzforschung*. 43 (1): 11–18.
- Nilsson RH & Hallenberg N (2003). Phylogeny of the *Hypochnicium punctulatum* complex as inferred from ITS sequence data. *Mycologia*. 95 (1): 54–60.
- Nilsson RH, Ryberg M, Sjökvist E & Abarenkov K (2011). Rethinking taxon sampling in the light of environmental sequencing. *Cladistics*. 27 (2): 197–203.
- Nobles MK (1948). Studies in Forest Pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Canadian Journal of Research*. 26 (C): 281–431.
- Nobles MK (1958). A rapid test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*. 36 (1): 91–99.
- Nobles MK (1965). Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*. 43: 1097–1139.
- Nobles MK & Nordin VJ (1955). Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. II. *Corticium vellereum* Ellis and Cragin. *Canadian Journal of Botany*. 33 (1): 105–112.
- Noris F, Siegel JA & Kinney KA (2011). Evaluation of HVAC filters as a sampling mechanism for microbial communities. *Atmospheric Environment*. 45 (2): 338–346.
- Novas MV & Carmarán CC (2008). Studies on diversity of foliar fungal endophytes of naturalised trees from Argentina, with a description of *Haplotrichum minutissimum* sp. nov. *Flora*. 203 (7): 610–616.
- Novas MV, Collantes M & Cabral D (2007). Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. *FEMS Microbiology Ecology*. 61 (1):164–173.

- Nowak DJ & Dwyer JF** (2007). Understanding the benefits and costs of urban forest ecosystems. En: *Urban and community forestry in the northeast*. Juser, JE (Ed.). Springer. Pp 25–46.
- Ohlde GW, Becker K, Akin DE, Rigsby LL & Lyon CE** (1992). Differences in rumen bacterial degradation of morphological fractions in eight cereal straws and the effect of digestion on different types of tissues and mechanical properties of straw stalks. *Animal Feed Science and Technology*. 36 (3–4): 173–186.
- Oses R, Valenzuela S, Freer J, Sanfuentes E & Rodriguez J** (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*. 33: 76–87.
- Oses R, Valenzuela S, Freer J, Baezab J & Rodriguez J** (2006). Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 57 (2): 129–135.
- Otjen L & Blanchette RA** (1982). Patterns of decay caused by *Inonotus dryophilus* (Aphyllophorales: Hymenochaetaceae), a white pocket rot fungus of oaks. *Canadian Journal of Botany*. 60 (12): 2270–2779.
- Otjen L, Blanchette RA, Effland M & Leatham G** (1987). Assessment of 30 white rot basidiomycetes for selective lignin degradation. *Holzforschung*. 41 (6): 343–349.
- Pajot HF, Figueroa LIC, Spencer JFT & Fariña JI** (2008). Phenotypical and genetic characterization of *Trichosporon* sp. HP-2023. A yeast isolate from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina) with dye-decolorizing ability. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. 94 (2): 233–244.
- Parfitt D, Hunt J, Dockrell D, Rogers HJ & Boddy L** (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. *Fungal Ecology*. 3 (4): 338–346.
- Park Y-J, Kwon O-C, Son E-S, Yoon D-E, Han W, Yoo Y-B & Lee C-S** (2012). Taxonomy of *Ganoderma lucidum* from Korea based on rDNA and partial β -tubulin gene sequence analysis. *Mycobiology*. 40 (1): 71–75.
- Pauleit S, Jones N, García-Martin G, García-Valdecantos JL, Rivière LM, Vidal-Beaudet L, Bodson M & Randrup TB** (2002). Tree establishment practise in towns and cities – Results from a European survey. *Urban Forestry & Urban Greening*. 1 (2): 83–96.
- Paulus B, Nilsson RH & Hallenberg N** (2007). Phylogenetic studies in *Hypochnicium* (Basidiomycota), with special emphasis on species from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 45 (1): 139–150.
- Pazoutova S, Srutka P, Holusa J, Chudickova M & Kolarik M** (2010). Diversity of xylariaceous symbionts in *Xiphydria* woodwasps: role of vector and a host tree. *Fungal Ecology*. 3 (4): 392–401.

- Pearce MH & Malajczuk N** (1990). Inoculation of *Eucalyptus diversicolor* thinning stumps with wood decay fungi for control of *Armillaria luteobubalina*. *Mycological Research*. 94 (1): 32–37.
- Peterson RA, Bradner JR, Roberts TH & Nevalainen KM** (2009). Fungi from koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces exhibit a broad range of enzyme activities against recalcitrant substrates. *Letters of Applied Microbiology*. 48 (2): 218–225.
- Petrini O & Carroll G** (1981). Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany*. 59 (5): 629–636.
- Petrini O & Fisher PJ** (1990). Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research*. 94 (8): 1077–1080.
- Pildain MB & Lopez SE** (2000). Biocontrol activity of *Epicoccum purpurascens* against xylophagous basidiomycetes from urban trees. Villa Carlos Paz, Argentina: V International PGPR Workshop.
- Pilotti M, Ponzio V & Motta E** (2002). Disorders of *Platanus acerifolia* in Italy associated with *Fusarium solani*. *Forest Pathology*. (32): 249–264.
- Pitt JI & Hocking AD** (1997). Fungi and food spoilage, 2^{da} Edition. Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra. 593 pp.
- Plan de Acción Cambio Climático Buenos Aires 2030** (2010). Agencia de Protección Ambiental. Ministerio de Ambiente y Espacio Público. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 169 pp. Disponible en: www.buenosaires.gov.ar. Último acceso el 12 de septiembre de 2013.
- Platas G, González V, Collado J, Martín J, Montes C & Peláez F** (2009). Ascription of poorly defined taxa to taxonomic entities using molecular phylogenies: a case study on *Nodulisporium* sp. producers of nodulisporic acid. *Mycotaxon*. 109: 443–460.
- Porras-Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh RL, Odenbach KJ, Lowrey T & Natvig DO** (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (9): 2805–2813.
- Promptuttha U, Hyde KD, McKenzie EHC, Peberdy JF & Lumyong S** (2010). Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Diversity*. 41: 89–99.
- Promptuttha I, Jeewon R, Lumyong S, McKenzie EHC & Hyde KD** (2005). Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliiflora* (Magnoliaceae). *Fungal Diversity*. 20: 167–186.
- Promptuttha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EGC, Hyde KD & Jeewon R** (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*. 53 (4): 579–590.

- Putoczky T, Gerrard J & Jackson S** (2007). Influence of boron on xylogenesis in *Pinus radiata* organ cultures. En: *Advances in plant and animal boron nutrition*. Xu F, Goldbach HE, Brown PH, Bell R, Fujiwara T, Hunt CD, Goldberg S & Shi L (Eds.). Dordrecht, Springer. Pp 47-62.
- Rajchenberg M** (1996). Los hongos pudridores de *Nothofagus pumilio* (Lenga): identificación de los cultivos puros. *Bosque*. 17 (2): 83–96.
- Rajchenberg M & Greslebin AG** (1995). Cultural characters, compatibility tests and taxonomic remarks of selected polypores of the Patagonian Andes forests of Argentina. *Mycotaxon*. 56: 325–346.
- Ragazzi A, Moricca S, Capretti P, Dellavalle I, Turco E** (2003). Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *Forest Pathology*. 33 (1): 31–38.
- Rambaut A** (2009). Tree Figure Drawing Tool, Version 1.3.1. Instituto de Biología Evolutiva, Universidad de Edinburgo, Reino Unido,
- Ramos Bononi VL, Kleber Morbeck de Oliveira A, Ratier de Quevedo J & de Mello Gugliotta A** (2008). Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Hoehnea*. 35 (4): 489–511.
- Raven PH, Evert RF & Eichhorn SE** (1992). Biología de las plantas. Editorial Reverté, Barcelona, España. 773 pp.
- Rayner ADM & Boddy L** (1988). Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. John Wiley & Sons, Nueva York, EE. UU. 587 pp.
- Redfern DB** (1991). *Melanotus proteus*: a newly recorded colonist of Sitka spruce stumps in Britain and a potential competitor for *Heterobasidion annosum*. *Plant Pathology*. 40 (3): 483–486.
- Reynolds ES** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 17 (1): 208–212.
- Robles CA, Carmarán CC & Lopez SE** (2011). Screening of xylophagous fungi associated with *Platanus acerifolia* in urban landscapes: Biodiversity and potential biodeterioration. *Landscape and Urban Planning*. 100 (1–2): 129–135.
- Robles CA, Carmarán CC & Lopez SE** (2012). Molecular techniques based on ITS analysis: useful tools for the identification of wood-decay Basidiomycetes in urban trees? *Kurtziana*. 37 (1): 91–108.
- Rodrigues A, Mueller UG, Ishak HD, Bacci M Jr & Pagnocca FC** (2011). Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. *FEMS Microbiology Ecology*. 78 (2): 244–255

- Rodríguez RJ, White Jr JF, Arnold AE & Redman RS** (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182 (2): 314–330.
- Romero AI & Minter D** (1988). Fluorescence microscopy: an aid to the elucidation of Ascomycetes structure. *Transactions of the British Mycological Society*. 90 (3):457–470.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA & Huelsenbeck JP** (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61 (3): 539–542.
- Rossman B, Müller H, Mpiira S, Tumuhairwe JB, Staver C & Berg G** (2012). Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (14): 4933–4941.
- Rungjindamai N, Pinruan U, Choeyklin R, Hattori T & Jones EBG** (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. *Fungal Diversity*. 33: 139–161.
- Saha BC** (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 30 (5): 279–291.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M & Sullivan TJ** (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29: 319–343.
- Saikkonen K, Wälli P, Helander M & Faeth SH** (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*. 9 (6): 275–280.
- Sakalidis ML, Hardy GE & Burgess TI** (2011). Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology*. 4 (1): 1–14.
- Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF & McCray EB** (2012). *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponible en: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Último acceso el 12 de septiembre de 2013
- Schmidt O** (2006). Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use. Springer, Berlin–Heidelberg, Alemania. 334 pp.
- Schmidt O, Gaiser O & Dujesiefken D** (2012). Molecular identification of decay fungi in the wood of urban trees. *European Journal of Forest Research*. 131 (3): 885–891.
- Schmidt O & Moreth U** (1998). Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis. *Holzforschung*. 52 (3): 229–233.
- Schubert M, Fink S & Schwarze FWMR** (2008). Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control*. 45 (1): 111–123.

- Schwarze FWMR** (2007). Review Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 21 (4): 133–170.
- Schwarze FWMR, Engels J & Mattheck C** (2000). Fungal strategies of wood decay in trees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 185 pp.
- Schwarze FWMR & Fink S** (1997). Reaction zone penetration and prolonged persistence of xylem rays in London plane wood degraded by the basidiomycete *Inonotus hispidus*. *Mycological Research*. 101 (10): 1207–1214.
- Schwarze FWMR, Lonsdale D & Fink S** (1995). Soft rot and multiple T-branching by the basidiomycete *Inonotus hispidus* in ash and London plane. *Mycological Research*. 99 (7): 813–820.
- Sede SM & Lopez SE** (1999a). Cultural studies of *Agrocybe cylindrica*, *Gymnopilus pampeanus* and *Oudemansiella canarii* (Agaricales) isolated from urban trees. *Mycotaxon*. 70: 377–386.
- Sede SM & Lopez SE** (1999b). Xylophagous fungi of urban trees in Buenos Aires City. *Mycologist*. 13(4): 173–175.
- Seifert KA** (1985). A monograph of *Stilbella* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*. 27: 1–235.
- Seifert KA, Morgan-Jones G, Gams W & Kendrick B** (2011). The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos. 997 pp.
- Shannon CE & Weaver W** (1949). The Mathematical Theory of Communication. The University of Illinois Press, Urbana, EE.UU. 117 pp.
- Sieber TN** (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*. 21 (2–3): 75–89.
- Slippers B & Wingfield MJ** (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*. 21 (2–3): 90–106.
- Slot JC, Hallstrom KN, Matheny PB, Hosaka K, Mueller G, Robertson DL & Hibbett DS** (2010). Phylogenetic, structural and functional diversification of nitrate transporters in three ecologically diverse clades of mushroom-forming fungi. *Fungal Ecology*. 3 (3): 160–177.
- Smith KD, May PB & Moore GM** (2001). The influence of waterlogging on the establishment of four Australian landscape trees. *Journal of Arboriculture*. 27 (2): 49–56.
- Sokal RR & Rohlf FJ** (1981). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research, 3rd Edition. Freedman & Company, Nueva York, EE.UU. 887 pp.
- Spurr AR** (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*. 26 (1–2): 31–43.
- Srutka P, Pazoutova S & Kolarik M** (2007). *Daldinia decipiens* and *Entonaema cinnabarina* as fungal symbionts of *Xiphydria* wood wasps. *Mycological Research*. 111 (2): 224–231.

- Stalpers JA** (1978). Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology*. 16: 1–248.
- StatSoft Inc.** (1999). STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK: StatSoft.
- Suarez F, Olivier G, Garcia-Hermoso D, Randriamalala E, Ghez D, Bruneau J, Kauffmann-Lacroix C, Bougnoux M-E & Lortholary O** (2011). Breakthrough *Hormographiella aspergillata* infections arising in neutropenic patients treated empirically with caspofungin. *Journal of Clinical Microbiology*. 49 (1): 461–465.
- Sun H** (2011). The biocontrol agent *Phlebiopsis gigantea*: efficacy and impacts on the stump bacterial biota and conifer tree defences. Academic Dissertation. Helsinki. 55 pp.
- Sun X, Guo L-D & Hyde KD** (2011). Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*. 47: 85–95.
- Sutton BC** (1961). Coelomycetes I. Part A: Developmental studies in *Pestalotiopsis*. Part B: Five species of *Pestalotiopsis*. *Mycological Papers*. 80: 1–16
- Sutton BC** (1980). The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, Inglaterra. 696 pp.
- Suzuki A, Fukiharu T, Tanaka C, Ohono T & Buchanan PK** (2003). Saprobiic and ectomycorrhizal ammonia fungi in the Southern Hemisphere. *New Zealand Journal of Botany*. 41 (3): 391–406.
- Suzuki A, Tanaka C, Bougher NL, Tommerup IC, Buchanan PK, Fukiharu T, Tsuchida S, Tsuda M, Oda T, Fukada J & Sagara N** (2002). ITS rDNA variation of the *Coprinopsis phlyctidospora* (syn.: *Coprinus phlyctidosporus*) complex in the Northern and Southern Hemispheres. *Mycoscience*. 43 (3): 229–238.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S** (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10): 2731–2739.
- Tao G, Liu Z, Sun B, Zhu Y, Cai L & Liu X** (2012). Occurrence and diversity of endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) in Guizhou, China. *African Journal of Microbiology Research*. 6 (12): 2859–2868.
- Tejesvi MV, Mahesh B, Nalini MS, Prakash HS, Kini JR, Subbiah V & Shetty HS** (2005). Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21 (8–9): 1535–1540.
- Telleria MT, Duenas M, Melo I, Hallenberg N & Martin MP** (2010). A re-evaluation of *Hypochnicium* (Polyporales) based on morphological and molecular characters. *Mycologia*. 102 (6): 1426–1436.

- Tello M-L, Redondo C, Gaforio L, Pastor S & Mateo-Sagasto E** (2005). Development of a disease severity rating scale for plane tree anthracnose. *Urban Forestry & Urban Greening*. 3 (2): 93–101.
- ter Braak, C.J.F. & Šmilauer P** (2002). CANOCO. Reference manual and user's guide to CanoDraw for windows user's guide: software for canonical community ordination (Version 4.5). Ithaca, Nueva York, EE.UU.: Microcomputer Power.
- Terho M** (2009a). An assessment of decay among urban *Tilia*, *Betula*, and *Acer* trees felled as hazardous. *Urban Forestry & Urban Greening*. 8 (2): 77–85.
- Terho M** (2009b). What was behind the bark? – An assessment of decay among urban *Tilia*, *Betula* and *Acer* trees felled as hazardous in the Helsinki City area. *Dissertationes Forestales*. 81: 1–36.
- Terho M & Hallaksela A-M** (2008). Decay characteristics of hazardous *Tilia*, *Betula*, and *Acer* trees felled by municipal urban tree managers in the Helsinki City Area. *Forestry*. 81 (2): 151–159.
- Thomas SE, Crozier J, Aime MC, Evans HC & Holmes KA** (2008). Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycological Research*. 112 (7): 852–860.
- Tian XM, Yu HY, Zhou LW, Decock C, Vlasák J & Dai YC** (2013). Phylogeny and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex. *Fungal Diversity*. 58 (1): 159–169.
- Tomita F** (2003). Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*. 14:187–204.
- Thornton CR** (2009). Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16 (5): 756–764.
- Triebel D, Peršoh D, Wollweber H & Stadler M** (2005). Phylogenetic relationships among *Daldinia*, *Entonaema*, and *Hypoxylon* as inferred from ITS nrDNA analyses of Xylariales. *Nova Hedwigia*. 80 (1–2): 25–43.
- Udayanga D, Liu X, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali AHA & Hyde KD** (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 50 (1):189–225.
- Unterseher M, Peršoh D & Schnittler M** (2013). Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. *Fungal Diversity*. 60:43–54.
- Unterseher M & Schnittler M** (2010). Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*. 3 (4): 366–378.

- Vainio EJ, Hallaksela A-M, Lipponen K & Hantula J** (2005). Direct analysis of ribosomal DNA in denaturing gradients: application on the effects of *Phlebiopsis gigantea* treatment on fungal communities of conifer stumps. *Mycological Research*. 109 (1): 103–114.
- Van Oorschot CAN** (1980). A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Studies in Mycology*. 20: 1–89.
- Vasiliauskas R, Larsson E, Larsson KH & Stenlid J** (2005). Persistence and long-term impact of Rotstop biological control agent on mycodiversity in *Picea abies* stumps. *Biological Control*. 32 (2): 295–304.
- Verma VC, Gond SK, Kumar A, Kharwar RN & Strobel G** (2007). The Endophytic Mycoflora of Bark, Leaf, and Stem Tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). *Microbial Ecology*. 54 (1): 119–125.
- Verweij PE, Van de Nes J, Van Kasteren M, de Hoog GS, de Pauw BE & Meis JFGM** (1997). Fatal pulmonary infection caused by the Basidiomycete *Hormographiella aspergillata*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (10): 2675–2678.
- Vieira ML, Hughes AF, Gil VB, Alves TM, Zani CL, Rosa CA & Rosa LH** (2012). Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*. 58 (1): 54–66.
- Vigrow A, King B & Palfreyman JW** (1991). Studies of *Serpula lacrymans* mycelial antigens by western blotting techniques. *Mycological Research*. 95 (12): 1423–1428.
- Vlasák J, Kout J & Ryvarden L** (2012). New records of polypores from southern Florida. *Mycotaxon*. 118: 159–176.
- Volkenant K** (2007). Totholz als Lebensraum von Mycozönosen im fortschreitenden Zersetzungsprozess: eine Chronosequenzstudie an *Fagus sylvatica*-Totholz im National Park Kellerwald-Edersee. Göttingen: Forschungszentrum Waldökosysteme. 161 pp.
- Von Arx JA** (1981). The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 3rd Edition. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 424 pp.
- Von Arx JA, Guarro J & Figueras MJ** (1986). The Ascomycetes Genus *Chaetomium*. *Nova Hedwigia*. 84: 1–162.
- Ward G, Hadar Y & Dosoretz CG** (2004). The biodegradation of lignicelluloses by white rot fungi. En: *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Arora DK (Ed.). Marcel Dekker, Nueva York, EE. UU. Pp 393–407.
- Watanabe T** (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species, 2nd Editon. CRC Press, Florida, EE.UU. 504 pp.
- Wheeler W, Aagesen L, Arango C, Faivovich J, Grant T, D' Haese C, Janies D, Smith W, Varón A & Giribet G** (2006). Dynamic Homology and Phylogenetic Systematics: a

- Unified Approach Using POY. The American Museum of Natural History, Nueva York, EE. UU.
- White TJ, Bruns TD, Lee S & Taylor JW** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sininsky J & White TJ (Eds). Academic Press, Nueva York, EE.UU. Pp. 315–322.
- Woods C M, Woodward S & Redfern DB** (2005). *In vitro* interactions in artificial and wood-based media between fungi colonizing stumps of Sitka spruce. *Forest Pathology*. 35 (3): 213–229
- Worrall JJ** (1991). Media for selective isolation of Hymenomycetes. *Mycologia*. 83 (3): 296–302.
- Worrall JJ, Anagnost SE & Zabel RA** (1997). Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia*. 89 (2): 199– 219.
- Wright JE & Albertó E** (2002). Hongos. Guía de la región pampeana. I. Hongos con laminillas. LOLA, Buenos Aires. 168 pp.
- Wright JE & Deschamps JR** (1972). Basidiomycetes xilófagos de los bosques andino-patagónicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA*. Serie V, Patología Vegetal. 9 (3): 111–204.
- Wright JE & Deschamps JR** (1975). Basidiomycetes xilófilos de la región mesopotámica. II. Los géneros *Daedalea*, *Fomitopsis*, *Heteroporus*, *Laetiporus*, *Nigroporus*, *Rigidoporus*, *Perenniporia* y *Vanderbylia*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA*. Serie V, Patología Vegetal. 12 (3): 127–204.
- Wright JE & Deschamps JR** (1976). Basidiomycetes xilófilos de la región mesopotámica. III. Los géneros *Bjerkandera*, *Gloeophyllum*, *Hirchioporus*, *Hydnopolyporus*, *Phaeocoriolellus*, *Pycnoporus* y *Xerotinus*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA*. Serie V, Patología Vegetal. 13 (2): 27–69.
- Wright JE, Deschamps JR & Rovetta FS** (1973). Basidiomycetes xilófilos de la región mesopotámica. I. Políporos trametoides. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA*. Serie V, Patología Vegetal. 10 (3): 117–179.
- Wright JE & Iaconis CL** (1955). Estudios sobre Basidiomycetes III. –*Polyporus rickii*” f. sp. –*negundis*” sobre arces vivos. *Revista de Investigaciones Agrícolas*. 9 (2): 97–109.
- Wright JE & Wright AMB** (2005). Check-list of the mycobiota of Iguazú National Park (Misiones, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 40 (1–2): 23–44.
- Wu S-H, Dai Y-C, Hattori T, Yu T-W, Wang D-M, Parmasto E, Chang H-Y & Shih S-Y** (2012). Species clarification for the medicinally valuable –*sanghuang*” mushroom. *Botanical Studies*. 53 (1): 135–149.

- Yong X, Guo L-A & Wu W-F** (2003). Identification of *Taxus cuspidate* sieb. et Zucc. endophytic fungi-new species, species known and their metabolite. *Journal of Forestry Research*. 14 (4): 290–294.
- Yuan ZL, Rao LB, Chen YC, Zhang CL & Wu YG** (2011). From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzenensis*. *Fungal Biology*. 115 (3): 197–213.
- Zak JC & Willig MR** (2004). Fungal biodiversity patterns. En: *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. Mueller GM, Bills GF & Foster MS (Eds.). Elsevier Academic Press, EE.UU. Pp. 59–75.
- Zappala A, Maluh LA & Bargiela C** (1979). Hongos xilófagos, especies más frecuentes en el ambiente capitalino. Actas del 1er Congreso Intermunicipal de Botánica, fascículo 3.
- Zhou LW & Qin WM** (2012). *Inonotus tenuicontextus* sp. nov. (Hymenochaetaceae) from Guizhou, southwest China with a preliminary discussion on the phylogeny of its kin. *Mycological Progress*. 11 (3): 791–798.



Anexo

1. Medios de cultivo

Medio utilizados para aislamientos

Extracto de malta con antibiótico (MeClo)

Agar-agar (Oxoid Ltd., Inglaterra)	20 gr
Extracto de malta (Oxoid Ltd., Inglaterra)	12,5 gr
Cloranfenicol (Elea, Argentina)	100 mg
Agua destilada	1000 ml

Medio Selectivo para basidiomicetes (BDS) modificado de Worrall, 1991).

Agar-agar (Oxoid Ltd.)	15 gr
Benomyl (benlate)	40 mg
Cloranfenicol	100 mg
Dicloran	20 mg
Extracto de malta (Oxoid Ltd.)	15 gr
Agua destilada	1000 ml

Extracto de malta nutritivo con peptona (MEP)

Agar-agar (Oxoid Ltd.)	20 gr
Extracto de malta (Oxoid Ltd.)	20 gr
Glucosa (Anedra S. A.)	20 gr
Peptona (Merck, Darmstadt, Alemania)	1 gr
Agua destilada	1000 ml

Medios para identificación

Medio de Nobles (Nobles, 1948)

Agar granulado (BD Chemicals, Francia)	20 gr
Extracto de malta (Oxoid Ltd.)	12,5 gr
Agua destilada	1000 ml

Extracto de malta agarizado (MEA)

Agar-agar (Oxoid Ltd.)	20 gr
Extracto de malta (Oxoid Ltd.)	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Medio papa glucosa agarizado (APG)

Papa pelada	300 gr
Glucosa (Anedra S. A.)	10 gr
Agar-agar (Oxoid Ltd.)	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Las papas peladas fueron hervidas durante 1 hora, separándose luego el sobrenadante por filtración.

Medios para evaluar presencia de oxidasas

Medio con acido tánico/gálico

Acido tánico/gálico (Anedra S.A., Argentina)	5 gr
Agar-agar (Oxoid Ltd.)	20 gr
Extracto de malta (Oxoid Ltd)	15 gr
Agua destilada	1000 ml

Los ácidos y el agar se esterilizan por separado para evitar la hidrólisis. Se mezclan luego de retirar del autoclave.

Medio con tirosina

Agar-agar (Oxoid Ltd.)	15 gr
Tirosina (Anedra S.A.)	2 gr
Agua destilada	1000 ml

La tirosina y el agar se esterilizan por separado. Se mezclan luego de retirar del autoclave.

Medio con guayacol

Acido cítrico (ICN Biomedicals, EE.UU.)	3,66 gr
Agar-agar (Oxoid Ltd.)	15 gr
Extracto de malta (Oxoid Ltd.)	5 gr

Fosfato disódico (Na_2HPO_4) (Sigma Chemical Co., EE.UU.)	10,72 gr
Guayacol (BDH Biomedicals, Inglaterra)	2 ml
Agua destilada	1000 ml
Todos los componentes se esterilizan por separado, mezclándose al retirarlos del autoclave.	

Medio con p-cresol

Agar-agar (Oxoid Ltd)	15 gr
P-cresol (Alfa Aesar, Inglaterra)	1 ml
(se agrega en último lugar debido a su toxicidad).	
Agua destilada	1000 ml

Medio para identificación para *Aspergillus*

C y A

K_2HPO_4 dibásico	1 gr
Czapeck concentrado	10 ml
Solución de metales traza	1 ml
Extracto de levadura (Oxoid, Ltd.)	5 gr
Sacarosa (Anedra S.A.)	30 gr
Agar-agar (Oxoid Ltd.)	15 gr
Agua destilada	1000 ml

Solución de metales traza

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 gr
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 gr
Agua destilada	100 ml

Czapeck

Czapeck agarizado (Oxoid Ltd.)	45,4 gr
Agua destilada	1000 ml

2. Cultivos de endofitos

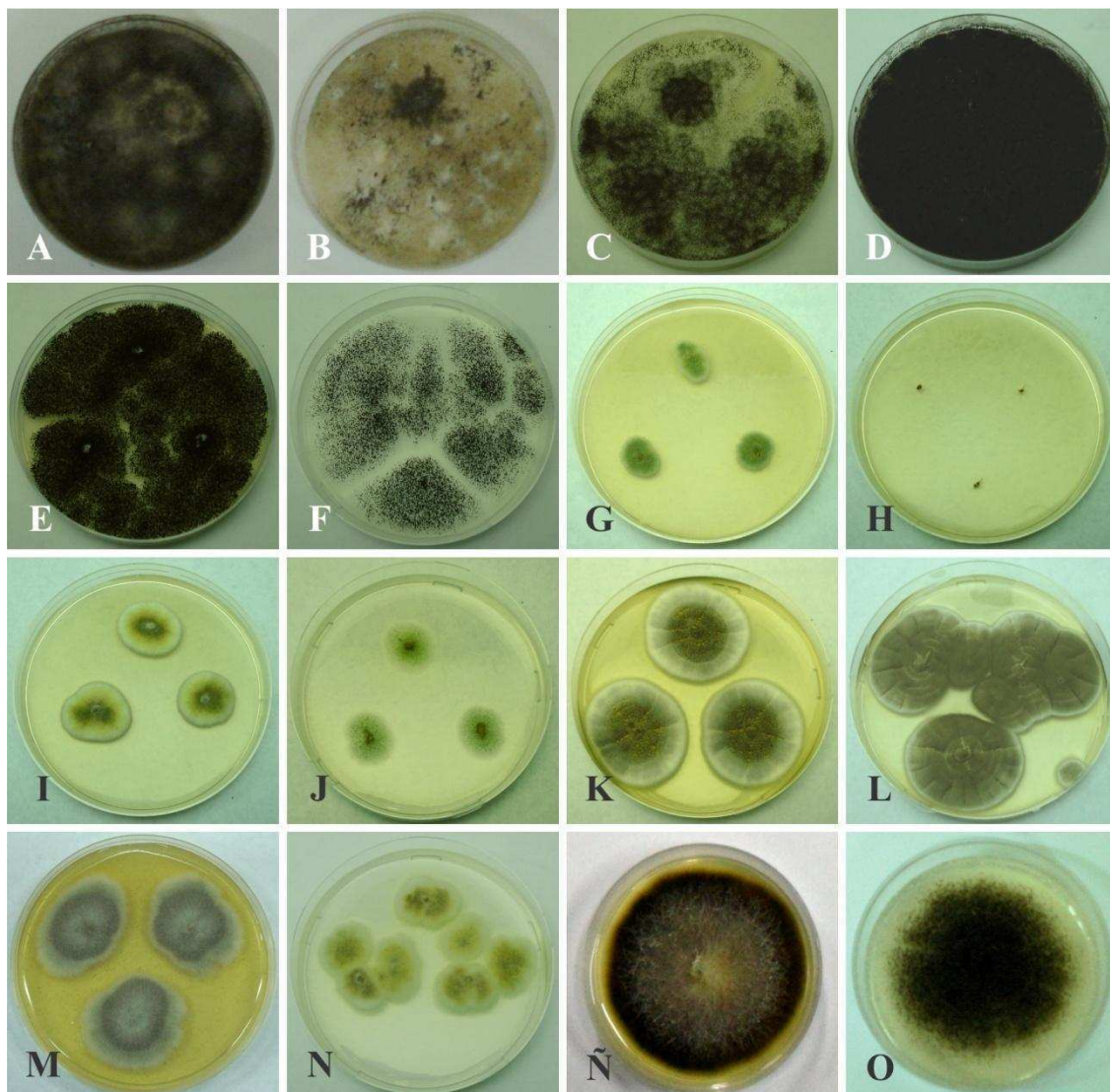


Figura 1': Imágenes de cultivos. (A) *Alternaria alternata* (MEA 2%); (B) *Arthrinium phaeospermum* (MEA 2%); (C-F) *Aspergillus niger*. (C) Medio CyA luego de 1 semana a 25°C; (D) Medio CyA luego de 1 semana a 37°C; (E) MEA con peptona luego de 1 semana a 25°C; (F) Medio czapeck luego de 1 semana a 25°C; (G-J) *Aspergillus reptans*. (G) Medio CyA luego de 1 semana a 25°C; (H) Medio CyA luego de 1 semana a 37°C; (I) MEA con peptona luego de 1 semana a 25°C; (J) Medio czapeck luego de 1 semana a 25°C. (K-N) *Aspergillus ustus*. (K) Medio CyA luego de 1 semana a 25°C; (L) Medio CyA luego de 1 semana a 37°C; (M) MEA con peptona luego de 1 semana a 25°C; (N) Medio czapeck luego de 1 semana a 25°C; (Ñ) *Bipolaris australiensis*; (O) *Chaetomium funicola* (MEA 2%).

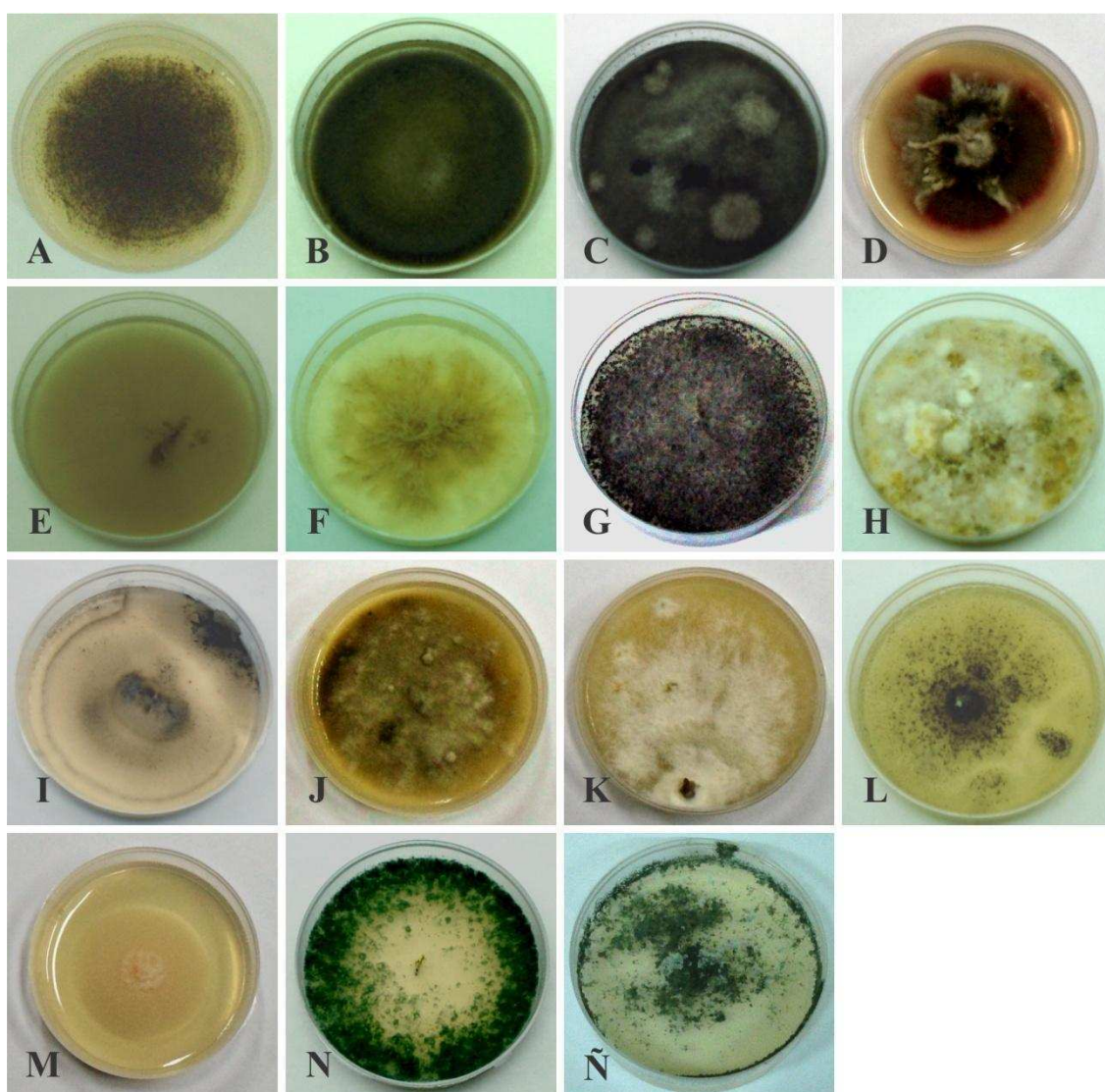


Figura 2’: Imágenes de cultivos en medio MEA 2%. (A) *Chaetomium globosum* (MEA 2%); (B) *Cladosporium cladosporioides*; (C) *Curvularia lunata*; (D) *Epicoccum nigrum*; (E) *Fusarium solani*; (F) *Gliocladium penicilliioides*; (G) *Nodulisporium* sp.; (H) *Pestalotiopsis guepinii*; (I) *Phialemonium curvatum*; (J) *Phoma eupyrena*; (K) *Phomopsis archeri*; (L) *Pseudallescheria boydii*; (M) *Sarocladium strictum*; (N) *Trichoderma atroviride*; (Ñ) *Trichoderma harzianum*.

3. Resultados de Análisis Canónico de Correspondencias a través del programa CANOCO for Windows

ND: Nivel de disturbio

DAP: diámetro a la altura del pecho (cm)

Bas%: porcentaje de fragmentos de MM colonizados por basidiomicetes

Forward selection of environmental variables= 0

Scaling of ordination scores= 2

Diagnostics= 3

No samples omitted

Number of samples 28

Number of species 27

Number of occurrences 73

No interaction terms defined

No transformation of species data

No species-weights specified

No sample-weights specified

No downweighting of rare species

No. of active samples 25

No. of passive samples 0

No. of active species 27

Total inertia in species data=

Sum of all eigenvalues of CA= 9,85484

**** Weighted correlation matrix (weight = sample total) ****

SPEC AX1	1							
SPEC AX2	0,0201	1						
SPEC AX3	-0,0853	-0,0183	1					
SPEC AX4	0	0	0	1				
ENVI AX1	0,9566	0	0	0	1			
ENVI AX2	0	0,9118	0	0	0	1		
ENVI AX3	0	0	0,783	0	0	0	1	
ENVI AX4	0	0	0	0	0	0	0	0
ND	-0,1928	0,8915	0,0456	0	-0,2016	0,9777	0,0582	0
DAP	-0,5188	0,22	0,6301	0	-0,5424	0,2413	0,8047	0
Bas%	-0,9146	0,2145	-0,1366	0	-0,9562	0,2352	-0,1744	0
	SPEC AX1	SPEC AX2	SPEC AX3	SPEC AX4	ENVI AX1	ENVI AX2	ENVI AX3	ENVI AX4

ND	1		
DAP	0,3921	1	
Bas%	0,4126	0,435	1
	ND	DAP	Bas%

N	name	(weighted) mean	stand. dev.	inflation factor
1	SPEC AX1	0	1,0454	
2	SPEC AX2	0	1,0968	
3	SPEC AX3	0	1,2772	
4	SPEC AX4	0	1	
5	ENVI AX1	0	1	
6	ENVI AX2	0	1	
7	ENVI AX3	0	1	
8	ENVI AX4	0	0	
34	ND	1,7797	0,7494	1,292
35	DAP	58,0718	8,5391	1,3223
37	Bas%	0,0048	0,0047	1,3485

**** Summary ****

Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues	0,741	0,693	0,491	1	9,855
Species-environment correlations	0,957	0,912	0,783	0	
Cumulative percentage variance					
of species data	7,5	14,6	19,5	29,7	
of species-environment relation	38,5	74,5	100	0	

Sum of all eigenvalues 9,855

Sum of all canonical eigenvalues 1,925

*** Unrestricted permutation ***

Seeds: 23239 945

**** Summary of Monte Carlo test ****

Test of significance of first canonical axis:

eigenvalue= 0,741

F-ratio= 1,708

P-value= **0,0310**

Test of significance of all canonical axes:

Trace= 1,925

F-ratio= 1,700

P-value= **0,0010**

(999 permutations under reduced model)

4. Tablas de estadística

	<i>P. c.</i>	<i>N. sp. E</i>	<i>N. sp. P</i>	<i>I. r.</i>	<i>H. sp.</i>	<i>C. c.</i>	<i>G. v.</i>
<i>P. c.</i>							
<i>N. sp. E</i>	0,47						
<i>N. sp. S</i>	2,78 10 ⁻⁰⁴	0,23					
<i>I. r.</i>	3,21 10 ⁻⁰⁵	1,06 10 ⁻⁰⁴	0,32				
<i>H. sp.</i>	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵			
<i>C. c.</i>	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	0,03		
<i>G. v.</i>	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,25 10 ⁻⁰⁵	
<i>Control</i>	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰⁵	3,22 10 ⁻⁰⁵	1,00

Tabla 1°: Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para los ensayos de degradación in vitro de diferentes especies de basidiomicetes. *P. c.* = *Phanerochaete chrysosporium* (endofítico); *N. sp. E*= *Nodulisporium* sp. endofítico; *N. sp. P*= *Nodulisporium* sp. patógeno; *I. r.*= *Inonotus rickii* (endofítico); *H. sp.*= *Hymenochaete* sp.; *C. c.*= *Coprinopsis cinerea* (endofítico); *G. v.*= *Granulobasidium vellereum* (endofítico). Los valores en rojo indican diferencias significativas (p<0,01).

	<i>Ba</i>	<i>G.v.+B.a.</i>	<i>G.r.</i>	<i>G.v.+G.r.</i>	<i>I.r.</i>	<i>G.v.+I.r.</i>	<i>T.t.</i>	<i>G.v.+T.t.</i>	<i>Control</i>
<i>B.a.</i>									
<i>G.v. + B.a.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵								
<i>G.r.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵							
<i>G.v. + G.r.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	1,00	2,61 10 ⁻⁰⁵						
<i>I.r.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,00	2,61 10 ⁻⁰⁵					
<i>G.v. + I.r.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	1,00	2,61 10 ⁻⁰⁵	1,00	2,61 10 ⁻⁰⁵				
<i>T.t.</i>	0,00	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,10	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵			
<i>G.v. + T.t.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	1,00	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,97	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,80	2,61 10 ⁻⁰⁵		
<i>Control</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,62 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,72 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	
<i>G.v.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,62 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,84 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	5,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	1,00

Tabla 2°: Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para los ensayos de control biológico en los cuales se inoculó primero al antagonista. *G. v.*= *Granulobasidium vellereum*; *B. a.*= *Bjerkandera adusta*; *G. r.*= *Ganoderma resinaceum*; *I. r.*= *Inonotus rickii*; *T. t.*= *Trametes trogii*. Los valores en rojo indican diferencias significativas (p<0,01).

	<i>Ba</i>	<i>B.a.+G.v.</i>	<i>G.r.</i>	<i>G.r.+G.v.</i>	<i>I.r.</i>	<i>I.r. +G.v.</i>	<i>T.t.</i>	<i>T.t.+G.v.</i>	<i>Control</i>
<i>Ba</i>									
<i>B.a. + G.v.</i>	1,00								
<i>G.r.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵							
<i>G.r. + G.v.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,52						
<i>I.r.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,00	0,63					
<i>I.r. + G.v.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵				
<i>T.t.</i>	0,00	0,01	0,09	2,99 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵			
<i>T.t. + G.v.</i>	0,90	2,61 10 ⁻⁰⁵	4,28 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,72		
<i>Control</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,00	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	
<i>G.v.</i>	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	0,00	2,61 10 ⁻⁰⁵	2,61 10 ⁻⁰⁵	1,00

Tabla 3’: Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para los ensayos de control biológico en los cuales se inoculó primero al xilófago. *G. v.*= *Granulobasidium vellereum*; *B. a.*= *Bjerkandera adusta*; *G. r.*= *Ganoderma resinaceum*; *I. r.*= *Inonotus rickii*; *T. t.*= *Trametes trogii*. Los valores en rojo indican diferencias significativas ($p<0,01$).

	Xilófagos sin <i>G. vellereum</i>	<i>G. vellereum</i> + Xilófagos	Xilófagos + <i>G. vellereum</i>
Xilófagos sin <i>G. vellereum</i>			
<i>G. vellereum</i> + Xilófagos	2,18 10 ⁻⁰⁵		
Xilófagos + <i>G. vellereum</i>	3,85 10 ⁻⁰⁵	2,18 10 ⁻⁰⁵	

Tabla 4’: Prueba a posteriori de Tukey (HSD) para efecto de presencia de antagonista para los ensayos de control biológico. Los valores en rojo indican diferencias significativas ($p<0,01$).

Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>G. vellereum</i>	1	97,62	97,62	393,18	0
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 5’: *B. adusta* con y sin *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>G. vellereum</i>	1	45,77	45,77	184,36	0
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 6’: *G. resinaceum* con y sin *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	p
<i>G. vellereum</i>	1	21,87	21,87	88,09	3,47 10 ⁻¹⁸
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 7’: *I. rickii* con y sin *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	p
<i>G. vellereum</i>	1	56,33	56,33	226,89	0
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 8’: *T. trogii* con y sin *G. vellereum*

Pruebas de efectos simples para los tratamientos donde se inoculó previamente con los xilófagos.

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	p
<i>G. vellereum</i>	1	7,21 10 ⁻⁵	7,21 10 ⁻⁵	0,00	0,97
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 9’: *B. adusta* con y sin *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	p
<i>G. vellereum</i>	1	1,42	1,42	5,71	0,02
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 10’: *G. resinaceum* con y sin *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	p
<i>G. vellereum</i>	1	26,24	26,24	105,67	5,49 10 ⁻²¹
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 11’: *I. rickii* con y sin *G. vellereum*

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado mínimo	<i>F</i>	p
<i>G. velleum</i>	1	1,12	1,12	4,53	0,03
Error	257	63,81	0,25		
Total	258				

Tabla 12’: *T. trogii* con y sin *G. velleum*

5. Indicadores de disturbio antrópico relativo en cada Sitio muestreado.

Sitio	Sitio A	Sitio B	Sitio C	Sitio D
CO	1,4	43,2	17,9	0
Gas	0,7	1,2	0,8	0
SU	0,7	1,2	0,8	0
V/m	4	47,6	4,1	0*

Los valores representan el porcentaje de cada indicador sobre el número total de edificios. CO: comercios; Gas: gasolinera (estación de servicio); SU: supermercados; V/m: número de vehículos por minuto. *: Los valores de vehículos por minuto en el Sitio D se han considerado nulos ya que los árboles de este Sitio no son de alineación, se encuentran en predio cercano a la Avenida Lugones.

Los valores del Sitio A, Sitio B y Sitio C han sido publicados previamente en Robles *et al.* (2011).