

Tesis Doctoral

# Endofitos de *Blepharocalyx salicifolius*: diversidad y factores que modulan el ensamble de las comunidades fúngicas

Español, Esteban

2014-10-17

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Español, Esteban. (2014-10-17). Endofitos de *Blepharocalyx salicifolius*: diversidad y factores que modulan el ensamble de las comunidades fúngicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Español, Esteban. "Endofitos de *Blepharocalyx salicifolius*: diversidad y factores que modulan el ensamble de las comunidades fúngicas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-10-17.



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Endofitos de *Blepharocalyx salicifolius*:  
diversidad y factores que modulan el ensamble de  
las comunidades fúngicas”**

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

**Esteban Español**

Directores: Dras. Carmarán, Cecilia Cristina; Novas, María Victoria  
Consejera de estudios: Dra. Lopez, Silvia Edith

Lugar de trabajo: Instituto PROPLAME-PRHIDEB, Laboratorio de  
Micología, DBBE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Buenos Aires, 2014

# “Endofitos de *Blepharocalyx salicifolius*: diversidad y factores que modulan el ensamble de las comunidades fúngicas.”

## Resumen

Se conoce como endofitos fúngicos a los hongos que viven asociados a los distintos tejidos de las plantas. Estos organismos no ocasionan síntomas aparentes de infección y, en esta asociación, se reconoce o sospecha una relación mutualista entre sus integrantes. Un modelo interesante desde el punto de vista ecológico y aplicado son los endofitos No-Clavicipitaceos (tipo III). Estos son transmitidos horizontalmente y colonizan casi todos los linajes de plantas, comprendiendo una enorme riqueza específica. En este marco, este trabajo tuvo como objetivo el estudio de la diversidad de endofitos fúngicos tipo III en diferentes poblaciones de *Blepharocalyx salicifolius* (planta nativa) analizando la diversidad de la comunidad endofítica foliar y el posible impacto de diferentes factores sobre el ensamble. Por otro lado se llevaron a cabo diferentes análisis a fin de establecer si los endofitos fúngicos provienen de inóculos que circulan a través del corredor biológico, manteniendo el flujo genético entre las comunidades y, que la filiación de estas poblaciones puede ser detectada por el estudio poblacional mediante métodos moleculares.

Se seleccionaron cuatro áreas, asociadas con el corredor biológico del Rio Paraná-Río de la Plata. Se estudiaron las comunidades fúngicas endofíticas foliares mediante: aislamiento de cepas y su posterior cultivo e identificación por métodos de análisis

macro, micro morfológicos y a través de una aproximación multigénica. Se describen un total de 18 especies, solo 2 de ellas no habían sido previamente descritas sobre este hospedante y una tercera constituye una nueva especie para la ciencia. El análisis de la composición de las distintas comunidades a través de sus índices de riqueza y diversidad, permitió reconocer que sitio con menor disturbio antropogénico presentaban mayor riqueza de organismos endófitos.

Entre las cepas obtenidas, se seleccionó aquellas pertenecientes al género *Colletotrichum* como indicador, para el estudio de la influencia del corredor biológico sobre el ensamblaje de la comunidad fúngica, por ser el que presentó más cepas en común entre los sitios asociados al corredor.

Los resultados indican la presencia de distintas especies de *Colletotrichum* asociadas a los diferentes sitios estudiados.

Entre las conclusiones más relevantes de este trabajo se destaca que las comunidades fúngicas foliares de *B. salicifolius* poseen una importante riqueza de endófitos foliares que varía entre 5 y 13 especies, que los corredores biológicos no parecen tener una influencia clave en el ensamblaje de la comunidad y que el disturbio antropogénico podría ser un factor adicional a los ya considerados, modulando la comunidad endofítica foliar. Por lo expuesto, este estudio aporta datos que permiten entender alguno de los factores que determinan cómo se establecen las comunidades fúngicas en la naturaleza.

Palabras claves: Argentina, *Blepharocalyx salicifolius*, Corredor Biológico, Endófitos fúngicos, disturbio antrópico, Myrtaceae

## Abstract

Fungal endophytes are associated with different living plant tissues. They do not present any external manifestation of their presence, and do not cause apparent symptoms of infection. This association is recognized as or suspected to be a mutualistic relationship between its members. From the ecological and applied point of view the Non-Clavicipitaceous (Type III) endophytes are an interesting model. They are transmitted horizontally and colonize almost all lineages of plants, comprising huge species richness. For these reasons, this study aimed to study the diversity of fungal endophytes type III on a native plant (*Blepharocalyx salicifolius*) analyzing the diversity of foliar endophytic community and the potential impact of different factors on the assembly. various analyzes was conducted to determine whether the fungal endophytes come from inoculums that flow through the biological corridor, maintaining a gene flow between populations, and that the relation of these populations can be detected by molecular methods.

Four areas were selected related to the biological corridor of the Rio Paraná-Río de la Plata. Endophytic fungal foliar communities were studied by: isolation of strains and subsequent cultivation and identification methods of macro and micro analysis morphological and through a multigenic approximation. A total of 18 species are described, only 2 of them had been previously described on this host and one of them is a new species to science. The analysis of the composition of different communities allowed us to recognize, through richness and diversity indices, that sites with less anthropogenic disturbance had higher richness of endophytic organisms.

Among the isolated organisms, the genus *Colletotrichum* was selected as a indicator, in order to study the influence of the biological corridor on fungal community

assemblages, because this genus was one of the most common between the sites associated with the corridor. The results indicate that the presence of different species of *Colletotrichum* is associated with the different sites studied.

The overall analysis of the results indicate that foliar endophytic fungal communities of *B. salicifolius* show significant richness of foliar endophytes that varies between 5 and 13 species, that biological corridors do not seem to have a key influence on the assemblage of the endophytic community and that anthropogenic disturbance could be an additional factor to those already considered, and that could modulates the foliar endophytic community.

This study provides information that allows us to understand some of the factors that determine how fungal communities are established in nature.

## Agradecimientos

- A mis directoras Dra. Cecilia C. Carmarán y Dra. María Victoria Novas, por darme esta gran oportunidad y haber dirigido mi formación, por su dedicación, su paciencia y la confianza que depositaron en mí.
- Al Instituto PROPLAME-PRHIDEB por haberme brindado el espacio y los recursos para la realización de esta tesis.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por las becas otorgadas para la realización de este Doctorado.
- A Pato, mi maestra en la parte molecular.
- A la Dra. Andrea Romero, por su ayuda y consejos en la identificación de especies.
- A la Dra. Silvia Lopez por su ayuda y consejo.
- Al Dr. Pablo Picca, por su ayuda con los muestreos de árboles.
- A Mariana, Fernanda, Esteban Ceriani, Pato, Leo, Vicky Novas, Vicky Vignale, Alejandro, Sandy, Pablo, Agustina, y Silvia Castellani por compartir el día a día.
- A Laura por sus historias y por conseguir esos papers difíciles.
- A Susana Bonada, Susi Pereira, Silvina y Lili.
- A Carolina A. Robles por su gran apoyo y ayuda.
- A mis amigos Fernando, Juan, Patricio por su amistad y apoyo.
- A mi Madre, a mi Padre, a mi hermano, a toda mi familia y amigos, por su continuo apoyo y confianza.

"Lo que aún está quieto es fácil de coger.  
Lo que aún no se manifiesta es fácil de tener en cuenta.

Lo que aún es frágil se puede quebrar con facilidad.  
Lo que aún es pequeño puede dispersarse fácilmente.

Influir en lo que no existe todavía.  
Ordenar lo que aún no está desordenado.

Un árbol cuyo grosor es de una braza,  
nace de un tallo fino como un cabello.

Una torre de nueve plantas  
se levantará con un montículo de tierra.

Un viaje de mil millas  
empieza con un solo paso".

**Tao Te King. Lao Tse**

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

**Hypatia de Alejandría**



# *Índice*

---

Introducción .....	1
Hipótesis.....	14
Objetivos .....	16
Objetivos.....	17
Capítulo 1 .....	19
Introducción .....	20
Materiales & Métodos .....	23
Resultados .....	31
Discusión .....	81
Capítulo 2 .....	86
Introducción .....	87
Materiales y Métodos .....	90
Resultados .....	93
Discusión .....	105
Capítulo 3 .....	108
Introducción .....	109
Materiales y Métodos .....	112
Resultados .....	130
Discusión .....	168
Discusión general .....	173
Conclusiones.....	175
Bibliografía .....	177

# *Introducción*

---

El estudio de los endofitos fúngicos representa actualmente un área de investigación emergente con grandes desafíos que pueden ser afrontados desde diferentes subdisciplinas como la taxonomía, ecología, genética entre otras. Los resultados de investigaciones en estos ámbitos podrían aportar información valiosa para diferentes campos de aplicación, desde la agroindustria, la conservación de la biodiversidad hasta la salud humana. El trabajo que se presenta a continuación pretende representar un pequeño aporte a esta nueva e interesante área del conocimiento.

### ***El Área de Estudio: “El bosque en galería”***

El territorio Argentino incluye una gran variedad de regiones fitogeográficas (Cabrera 1976; Cabrera 1994) que contiene diversos tipos de clima y alberga una biodiversidad enorme. El noreste está caracterizado por la presencia de grandes cursos de agua (Oldani 1990) que incluso tienen aportes de otros países, además las mayoría de las reservas naturales de la región incluyen en su territorios arroyos y ríos.

El sistema fluvial Paraguay-Paraná es un corredor natural de 3400 km de largo, que corre a través de varios ecosistemas diferentes (bosques tropicales lluviosos, sabana, estepas y matorrales) entre los 16° a 34° de latitud sur. Neiff et al. (2005) postularon que todos los paisajes en cada trayecto del río son unidades ecológicas interconectadas por flujos de información horizontal (nutrientes, cieno, semillas, huevos, etc.). Este sistema fluvial conjuntamente con el río Uruguay, convergen en el Río de la Plata, uno de los más importantes ríos en Argentina.

La vegetación en este sistema fluvial presenta características tipo jungla con grandes árboles y baja luz diurna que mantienen la humedad de la atmosfera y el suelo,

promoviendo el desarrollo de plantas bajas (Barneche et al. 2010; Giudice et al. 2011).

La formación de la vegetación se extiende desde el norte hacia el sur, a lo largo de las costas de estos ríos, la cual se denomina “bosque en galería”.

La expresión bosques de galería alude a una formación dominada por árboles, que se extiende a manera de franja continua o semi continua, y que se destaca de los paisajes adyacentes. Esta expresión está referida a la forma que presentan los bosques y que es perceptible tanto a campo como en fotografías aéreas e imágenes satelitales, particularmente en los paisajes semiáridos donde marcan un contraste bien definido entre los sitios húmedos y el contexto árido (Neiff et al. 2004). Algunos autores prefieren denominarlos "galerías" aludiendo a un subtipo de bosques ribereños (Rosales y Leal 2003). En ambos casos se refiere que la posición del bosque es adyacente al curso de agua y la forma de las masas forestales es en franjas.

Los "bosques de galería" constituyen un tipo dentro de los bosques ribereños, caracterizado por la forma de barras, los bosques ribereños comprenden también a las masas forestales que crecen al borde de los ríos y arroyos, sin interesar la forma de los parches (barras, isletas, otra). Se puede denominar “bosques ribereños” o “riparios” a estos paisajes y definirlos como: paisajes naturales dominados por árboles, en las márgenes de los ríos, arroyos y otros cursos de agua, cuyo suelo es inundado sólo excepcionalmente, y por tiempos muy breves. La estructura y dinámica de la vegetación y de la fauna está controlada por factores locales (como clima, suelos, geomorfología). Existen especies higrófilas, pero también se registran muchas que corresponden a los paisajes adyacentes (Neiff et al. 2004).

### ***Los Hongos***

El reino Fungí está compuesto por organismos eucariontes, heterótrofos que constituyen un grupo monofilético e incluye a los Phylum Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota, estos dos últimos siendo los más importantes a nivel cantidad de especies y diversidad total. Se ha estimado que existen entre 1.500.000 y 5.000.000 especies en todo el mundo (Hawksworth 2004; Porras-Alfaro y Bayman 2011; Blackwell 2011). Estos organismos son los principales responsables de la mineralización de residuos orgánicos, contribuyendo así al reciclaje de nutrientes, fertilidad del suelo, formación de materia orgánica (Orth et al. 1993; Schmidt 2006; Boer et al. 2005). Los hongos generan una gran variedad de estructuras, de reproducción, de resistencia y de tipo somático más complejas como los ascomas y basidiomas. Los hongos producen una gran variedad de enzimas extracelulares lo que les permite degradar compuestos complejos para nutrirse y producen metabolitos secundarios que presentan actividad antibiótica. Actualmente están siendo estudiados debido a que pueden ser utilizados como biocontroladores, estas propiedades hace que los hongos sean un foco de estudio más que interesante.

### *Los Endófitos*

La palabra endófito posee 2 componentes, una que se refiere a su localización en un hospedante, donde **endo** quiere decir “**dentro**”, y **fito** se refiere al tipo de hospedante y significa **planta**. De esta forma un endófito podría ser cualquier organismo que vive dentro de una planta, sin embargo esta breve definición incluiría a otros organismos que no son estrictamente endófitos. Aunque muchas definiciones han sido propuestas hasta la fecha (Hyde y Soyong 2008). Una de las más aceptadas es la propuesta por Wilson (1995) quien considera que la definición correcta es “Los endófitos son hongos o

bacterias los cuales en parte o todo su ciclo de vida invaden plantas vivientes produciendo infección, sin causar síntomas de enfermedad aparente”

Los endófitos fúngicos son un grupo polifilético, representado principalmente por ascomicetes, de amplia distribución (Arnold 2007b; Rodriguez et al. 2009) y han sido encontrados en todo tipo de plantas, desde palmeras, gramíneas e incluso líquenes. Por su importancia en la biodiversidad fúngica se considera que pueden afectar la diversidad y estructura de las comunidades vegetales (van der Heijden et al. 1998; Clay y Holah 1999; Hartnett y Wilson 1999; Iannone et al. 2012). Este grupo de organismos presentan dos tipos de transmisión entre plantas; la transmisión vertical, en la cual el hongo es transmitido desde las plantas madres a sus descendientes a través de semillas infectadas y la transmisión horizontal que se produce a partir de las propágulos sexuales o asexuales del hongo, que se transportan por aire, agua, lluvia, insectos, etc, una vez en contacto con un nuevo hospedante colonizan los nuevos tejidos (Saikkonen et al. 2004)

### ***Tipos de Endofitos***

En general son reconocidos dos grandes grupos de hongos endofíticos a partir de sus relaciones evolutivas, taxonomía, hospedantes, y funciones en el ecosistema. Los endófitos clavicipitáceos (C-endofitos Clase 1), presentes en un gran número de pastos, y los endofitos no-clavicipitáceos (NC-endofitos), que pueden recuperarse de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodriguez et al. 2009). Hasta el momento se han realizado una mayor cantidad de trabajos sobre C-endofitos, debido a su importante impacto en la agricultura (Panaccione et al. 2001; Novas et al. 2007; Iannone et al. 2012; Torres et al. 2012; Faeth y Saari 2012; Roberts et

al. 2014) y a la escasez de información sobre la importancia ecológica de los NC-endófitos (Arnold et al. 2003b; Rodríguez et al. 2009; Lau et al. 2013).

### ***C-endófitos***

Los endófitos Clase 1 representan a un número de especies clavicipitaceas filogenéticamente relacionadas que han sido ampliamente estudiadas. Estos endófitos se encuentran en muchas gramíneas, dentro de los tallos donde forman infecciones sistémicas intercelulares (Rodríguez et al. 2009). El tipo de transmisión de estos endófitos es principalmente vertical, donde el hongo se propaga de una planta a otra por medio de la infección de la semilla (Saikkonen et al. 2004). Generalmente se los asocia con beneficios para las plantas hospedante, aumentando la biomasa, confiriendo tolerancia a la sequía y produciendo alcaloides, químicos que son tóxicos para los animales disminuyendo así la herbivoría (Saikkonen et al. 2004; Rodríguez et al. 2009; Iannone et al. 2012). Sin embargo, estos beneficios conferidos parecen depender de la especie hospedante y genotipo, así como de las condiciones ambientales (Saikkonen et al. 2004; Faeth et al. 2006).

### ***NC-endófitos***

Los endófitos no clavicipitaceos conforman un grupo altamente diverso y pueden dividirse en 3 clases distintivas, las Clase 2, 3 y 4, las cuales están basadas 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).

### ***Endofitos Clase 2***

Los endofitos de Clase 2 pueden crecer tanto en tejidos aéreos como en 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 tener efecto sobre las células vegetales. Un aspecto único de los endofitos Clase 2 es su habilidad para conferirle a la planta tolerancia a hábitats con alto grado de estrés y presentar un bajo nivel de esporulación o formación de aporosios en las plantas colonizadas, pero emergen y aumentan su esporulación durante la senescencia vegetal (Rodriguez et al. 2008; Rodriguez et al. 2009).

### ***Endofitos Clase 3***

Los endofitos de Clase 3 se diferencian de las demás clases en que están casi exclusivamente restringidos a los tejidos aéreos. Han sido encontrados en todo tipo de linajes de plantas, así como en diferentes ambientes (Arnold y Herre 2003a; Bettucci et al. 2004; Arnold y Lutzoni 2007a; Rodriguez et al. 2009; Pérez et al. 2010; Suryanarayanan et al. 2011; U'Ren et al. 2012; Lau et al. 2013). Este grupo presenta una alta diversidad de especies dentro de cada planta o tejido vegetal y se transmiten horizontalmente (Arnold et al. 2003b; Saikkonen et al. 2004; Arnold y Lutzoni 2007a). Se hallan dentro de tejidos fotosintéticos, flores, frutos, madera y corteza interna (Rodriguez et al. 2009).



### ***Endofitos Clase 4***

Los endofitos de Clase 4 sólo se encuentran en raíces y también son conocidos como DSE: endofitos septados oscuros por sus siglas en inglés (Rodríguez et al. 2009). Son por lo general ascomicetes con estadio conidial o formas estériles que forman estructuras melanizadas tales como hifas inter o intracelulares y microesclerocios (Jumpponen y Trappe 1998). Al igual que los endofitos de clase 2 pueden colonizar extensamente el tejido vegetal y a diferencia de las Clases 2 y 3, se han realizado pocos 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.

### ***Endofitos de arboles***

Existen diversos estudios del rol de los endofitos dentro de la planta y del rol de los endofitos como saprófitos o patógenos (Arnold 2007b). Ciertos trabajos sugieren la existencia de una relación mutualista (Arnold et al. 2003b) mientras que otros indican relaciones patogénicas por parte de estos organismos fúngicos (Arnold 2007b; Sieber 2007). El estudio de la relación entre los organismos y en especial entre los endofitos y las plantas está enfocado en las variaciones de las comunidades de endofitos sugiriendo que esta nexo entre organismos podría depender de distintos factores como, el tipo de hospedante, el tipo de huésped y las condiciones ambientales. Con respecto a estas últimas las comunidades fúngicas a su vez dependen de factores ambientales como, fuente de carbono; nitrógeno; temperatura; pH; aeración y humedad (Thongsandee et al. 2012). Varios estudios señalan que los endofitos presentes en hojas y tejidos leñosos muestran algún grado de especificidad, así podrían estar asociados de un género o

especie de planta hospedante y que esta especificidad dependería de la química presente en las hojas o madera (Talley et al. 2002; Arnold et al. 2003b; Guo et al. 2008; Thongsandee et al. 2012). Sin embargo otros trabajos señalan lo contrario, que son los factores ambientales lo que determinan en gran medida la composición de la comunidad endofítica (Arnold 2007b; Arnold y Lutzoni 2007a; Helander et al. 2007; U'Ren et al. 2012; Lau et al. 2013).

La gran importancia agroeconómica de las gramíneas y el consecuente estudio intensivo de las mismas para obtener un mayor rendimiento, ha marcado una diferencia fundamental en el grado de conocimiento entre los endofitos de gramíneas y los árboles, por lo cual, posiblemente, la investigación de endofitos de árboles tenga su origen en esta diferencia en el grado de conocimiento entre este tipos de hospedantes. Uno de los primeros trabajos que inicio el estudio de endofitos de árboles fue el de Carroll y Carroll (1978), el cual se focalizó en endofitos de coníferas, encontrando diferentes grados de infección dentro de estos últimos. En cuanto a la diversidad de endofitos arbóreos, a la fecha diferentes aportes se han realizado hasta el momento registrando una gran cantidad, principalmente, de Basidiomicetes y Ascomicetes, y dentro de este último grupo una alta abundancia de tipo endofitos Clase 3. (Carroll y Carroll 1978; Petrini y Carroll 1981; Petrini 1986; Espinosa-Garcia y Langenheim 1990; Helander et al. 1993; McCutcheon y Carroll 1993; Petrini et al. 1993; Rollinger y Langenheim 1993; Gaylord et al. 1996; Faeth y Hammon 1997; Arnold et al. 2000; Gamboa y Bayman 2001; Gamboa et al. 2002; Arnold et al. 2007; Unterseher 2011; Gazis et al. 2011; Vaz et al. 2014) .

Una amplia variedad de interacciones entre endofitos fúngicos y plantas terrestres han sido descritas, desde mutualismo, comensalismo, simbiosis y patogenicidad. Las plantas terrestres representan para los microorganismos recursos y hábitats

ecológicamente complejos que son imprescindibles para su desarrollo y supervivencia. Esta asociación entre microorganismos y plantas terrestres son fundamentales, para los procesos ecológicos y el aprovechamiento de nutrientes tanto para la planta como para los endofitos (Hyde y Soyong 2008). Este grupo de organismo ha sido encontrado en casi todos los tejidos vegetales desde raíces, tallos y hojas, en un gran número de familias y géneros de plantas en todo el mundo. Además determinadas asociaciones pueden ser altamente dependientes entre los organismo involucrados, por lo cual no es de extrañar que los estados simbióticos hayan aparecido múltiples veces en el transcurso de la historia evolutiva entre hospedantes y hongos (Gamboa Gaitan 2006).

Los endofitos foliares son un grupo interesante debido a su amplia diversidad y su plasticidad para adaptarse a todas las latitudes y tanto a distintos hospedantes como a los factores ambientales cambiantes. El rol de los endofitos presentes en las gramíneas es parece ser más evidente que en las plantas arbóreas, ya que confieren a sus hospedantes adaptación a ambientes extremo y protección contra herbivoría (Gundel et al. 2006; Novas et al. 2007; Torres et al. 2012). Por lo tanto podemos especular que los endofitos foliares de árboles deben conferir ventajas a sus hospedantes contra distintos tipos de patógenos foliares. Estos endofitos representan actualmente fuentes potenciales de investigación y desarrollo en muchos campos de estudio, desde el agronómico, pasando por el biocontrol, obtención de compuestos activos y hasta su utilización como indicadores de biológicos (Arnold et al. 2003b; Marinho et al. 2005; Hyde y Soyong 2008; Mejía et al. 2008; Nath et al. 2012). Por lo tanto la obtención y caracterización taxonómica de cepas endofíticas es el puntapié inicial para la aumentar la disponibilidad de recursos biológicos de interés en diversas áreas de aplicación.

### ***Corredores biológicos***

Los corredores biológicos se definen como espacios delimitados que proporciona conectividad entre paisajes, ecosistemas y hábitats, naturales o modificados, para asegurar el mantenimiento de la diversidad biológica y los procesos ecológicos y evolutivos (Rojas y Chavarría 2013). Por lo tanto se pueden encontrar diferentes tipos de corredores, que podríamos clasificar en eólicos, hídricos, florísticos y/o faunísticos, cada uno de los cuales está determinado a su vez, por variables ambientales como la altitud, latitud, humedad del ambiente, corrientes de aire, lluvias y altura al nivel del mar. En el caso de los corredores hídricos, los ríos son corredores naturales que pueden atravesar grandes extensiones de territorio y diferentes tipos de clima dependiendo de su extensión, además proporcionan conectividad entre paisajes, ecosistemas y hábitats, transportando sedimentos, nutrientes, semillas, huevos y animales que se desarrollan en los mismo (Neiff et al. 2005).

### ***Blepharocalyx salicifolius***

Es un árbol de amplia distribución y es utilizada como planta medicinal por lo que está siendo estudiada por sus distintos compuestos activos, los cuales incluyen propiedades antiinflamatorias, antibacteriales, expectorantes, antidiarreico y antiescorbutica cuando se la prepara con vinagre, así como posibles efecto sobre *Leishmania amazonensis* (Limberger et al. 2001; Stefanello et al. 2011; Garneau et al. 2013). *Blepharocalyx Salicifolius* (Kunth.) O. Berg pertenece a la familia Myrtaceae la cual comprende alrededor de 100 géneros y 3.000 especies de árboles y arbustos, repartidas en todos los continentes, con regiones excepto en la Antártida, y con predominancia en las regiones tropicales y subtropicales el mundo.



Fotos tomadas de <http://floradeluruguay.blogspot.com.ar/2012/05/arrayan.html>.

Las Mirtáceas están caracterizadas por poseer hojas, con margen entero, opuesto o alterno, con glándulas translúcidas oleíferas en el limbo costilla submarginal y muy pequeñas estípulas, facilidad de hoja caduca. Las flores suelen ser hermafroditas, poliestambrica, blanca y de simetría radial, sin embargo, presentan numerosas excepciones (Lorenzi 1992). *Blepharocalyx salicifolius* es una especie que crece en regiones de Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina, donde es popularmente

conocida como “Anacahuita o Arrayan”, En Argentina está ampliamente distribuida y siempre documentada y asociada con arroyos y ríos (Larran et al. 2011).

Es en este contexto previamente descrito, se consideró de interés desarrollar estudios que permitan conocer la diversidad de especies endofíticas asociadas a *Blepharocalix salicifolius*, en poblaciones vegetales de esta especie asociadas al corredor biológico Uruguay-Río de Plata, analizando la diversidad de las comunidades y potenciales factores que podrían afectarlas y evaluando el efecto de los corredores biológicos sobre poblaciones endofíticas seleccionadas.

# *Hipótesis*

---

## Hipótesis

- ❖ Las comunidades endofíticas foliares presentan una importante riqueza de especies.
  
- ❖ La caracterización comparativa de comunidades de endofitos foliares de áreas naturales protegidas puede contribuir a la evaluación del estado de estos hábitats.
  
- ❖ Los endofitos fúngicos provienen de inóculos que circulan a través del corredor biológico, manteniendo el flujo genético entre estas poblaciones, y que la filiación de estas poblaciones puede ser detectada por el estudio poblacional mediante métodos moleculares.
  
- ❖ Factores como la especificidad tiene bajo o nula influencia en la composición de las comunidades foliares endofíticas.



# *Objetivos*

---

## Objetivos

### Generales:

- ❖ Contribuir al conocimiento sobre la diversidad de endófitos fúngicos en plantas nativas de Argentina.
- ❖ Evaluar el impacto de diferentes factores sobre el ensamblaje de las comunidades fúngicas.

### Específicos:

- ❖ Caracterizar la diversidad de endófitos fúngicos foliares sobre *Blepharocalyx salicifolius*.
- ❖ Analizar la especificidad de la comunidad fúngica foliar endofítica en *Blepharocalyx salicifolius*.
- ❖ Evaluar posibles factores ambientales que puedan influir en la composición de las comunidades endofíticas en *Blepharocalyx salicifolius*.
- ❖ Evaluar marcadores moleculares para caracterizar linajes dentro de las poblaciones de especies fúngicas endofíticas.

- ❖ Comparar mediante marcadores moleculares las poblaciones fúngicas y estudiar la influencia del corredor biológico sobre la dispersión de un grupo de taxones mediante análisis moleculares.

# *Capítulo 1*

---

**Diversidad de los endofitos foliares de**

*Blepharocalyx salicifolius*

## Capítulo 1

### Diversidad de los endofitos foliares de *Blepharocalyx salicifolius*

#### Introducción

Al día de la fecha los endofitos fúngicos han sido registrados en una gran variedad de hospedantes. Estos organismos habitan dentro del tejido foliar saludable sin manifestar ningún síntoma externo o estructura de reproducción aparente.

A pesar que los endofitos pueden recuperarse de cualquier tejido del hospedante, muchos parecen estar asociados a una región particular del tejido foliar (Arnold et al. 2005). Actualmente se acepta que la diversidad de los endofitos excede lo estudiado hasta el momento y que las regiones tropicales son las que poseen una mayor diversidad, aunque todavía no somos capaces de conocer con exactitud la cantidad de endofitos presentes en una simple hoja. Este obstáculo se debe en parte a que algunos de estos organismos no son cultivables en los medios convencionales utilizados hasta ahora, lo cual señalaría que estos hongos podrían tener alguna relación de dependencia con el hospedante.

Aunque el rol o la importancia ecológica de los endofitos no es muy clara, la riqueza encontrada es amplia y el número de especies registradas sigue aumentando (Arnold et al. 2005; Porras-Alfaro y Bayman 2011).

El estudio de los endofitos foliares de arbóreos comenzó lentamente con Carroll, trabajando sobre acículas de coníferas, en reservas naturales, estudiando la incidencia de estos hongos asintomáticos (Carroll y Carroll 1978). Sin embargo, uno de los grupos

hospedantes más estudiados hasta la fecha son las plantas tropicales debido al gran número de endofitos que pueden albergar en zonas cálidas, que son consideradas hotspots de biodiversidad (Arnold et al. 2005; Arnold 2008). La cantidad de hospedantes estudiados asciende constantemente debido al interés económico de estos endofitos fúngicos, en producir potenciales componentes con actividad biológica y por sus beneficios en contra patógenos (Wiyakrutta et al. 2004; Herre et al. 2007). Por otro lado muchos géneros y especies han sido aislados recurrentemente, como por ejemplo los géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum* (*Glomerella*), *Diplodia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Trichoderma*, *Septoria*, *Xylaria* y muchas otras (Gazis et al. 2011; Maheswari y Rajagopal 2011).

La caracterización de las comunidades fúngicas endofíticas pertenecientes a especies arbóreas ha tomado relevancia mundial, en parte debido, como ya fue mencionado, a su gran riqueza, y en parte por las implicancias ecológicas de esta interacción (Fröhlich y Hyde 1999; Arnold y Herre 2003a; Arnold 2007b). En Argentina se han realizado numerosos trabajos sobre los endofitos de pastos (Novas et al. 2003; 2005; 2007; 2009; Iannone et al. 2011; 2012). Sin embargo, solo se han realizado unos pocos en árboles (Cabral 1985; Durán et al. 2005; Weber et al. 2005; Novas y Carmarán 2008).

Más recientemente se realizaron estudios de los endofitos fúngicos foliares y de madera de *Ligustrum lucidum*, *Brussonetia papyrifera*, *Celtis occidentalis* y *Platanus acerifolia*, mostrando que dichos hospedantes albergan una rica comunidad endofítica caracterizada por pocas especies dominantes y muchas raras y se propuso especificidad de tejido y hospedante (Novas y Carmarán 2008; Errasti et al. 2010; Robles 2014; de Errasti A En prensa). Por todo lo expuesto, se consideró de interés continuar con los estudios ya iniciados sobre la caracterización de los endofitos fúngicos de árboles en

áreas protegidas expandiendo dichos estudios a la conservación de la diversidad fúngica en relación a los corredores biológicos en hospedantes nativos.

## **Objetivo**

Caracterizar la diversidad de endófitos fúngicos foliares sobre *Blepharocalyx salicifolius*

Analizar la especificidad de la comunidad fúngica foliar endofítica en *Blepharocalyx salicifolius*.

## **Materiales & Métodos**

### ***Hospedante seleccionado***

Se seleccionó una especie arbórea nativa que tuviera una amplia distribución en el corredor biológico antes mencionado. La especie seleccionada fue *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (familia Myrtaceae).

### ***Área de estudio***

Tres sitios de estudio fueron seleccionados para este trabajo (Fig. 1.1).



### *Mapa de los sitios de estudio*



**Figura 1.1.** Mapa del Noreste de Argentina. Indicando los sitios evaluados durante este estudio. Sitio 1: Reserva Natural de Punta Lara. Sitio 2: Reserva Ecológica Costanera Norte. Sitio 3: San Antonio de Areco. Sitios adicionales de comparación: i. Parque Nacional El Palmar, ii. Quebrada de los Cuervos (Uruguay). Flecha blanca: Río Paraná; flecha negra: Río Uruguay.

#### ***Sitio 1: Reserva Natural Punta Lara***

La Reserva Natural Punta Lara ( $34^{\circ}49'00''\text{S}$   $57^{\circ}58'00''\text{W}$ ) está localizada en el partido de Ensenada en la provincia de Buenos Aires a 12 km al norte de la ciudad de La Plata. Esta área protegida está rodeada por un importante distrito urbano e industrial. Presenta un bosque marginal desarrollado sobre los bordes y es probablemente el relicto más al sur de bosques en galerías asociados con los ríos Paraná y Uruguay (Giudice et al. 2011). Esta reserva tiene un área total de 6000 hectáreas de ecosistema natural sin procesos críticos de transformación de paisaje (disturbio antrópico) (Fig. 1.1).

### ***Sitio 2: Reserva ecológica Costanera Norte***

Se encuentra ubicada al noreste de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, próxima al Río de Plata (34°32'20"S, 58°26'36"W) (Fig. 1), y constituye el resultado de numerosos cambios en la línea costera. Esta reserva es de origen antrópico, presentando una comunidad de plantas con una composición y estructura pobremente desarrollada. Muchas de las especies de plantas establecidas provienen del Delta del Paraná y han sido dispersadas por el Río de la Plata (Barneche et al. 2010). Esta reserva ocupa una superficie pequeña de 18 hectáreas y limita con la Ciudad de Buenos Aires.

### ***Sitio 3: San Antonio de Areco***

Dado que las áreas mencionadas anteriormente tienen algún nivel de protección, un tercer sitio con una completa transformación del ecosistema fue incluido en el análisis San Antonio de Areco (sitio 3), ubicado en la provincia de Buenos Aires (34°15'43"S 59°28'0"W), es un área rural donde una pequeña población de *B. salicifolius* fue detectada. Esta área rural está a 113 km del sitio 2 y a 134 km del sitio 1 (Fig. 1.1).

### ***Muestreo***

Hojas de *Blepharocalyx salicifolius* fueron muestreadas en los tres sitios. Diez árboles fueron seleccionados aleatoriamente en el sitio 1 y en el sitio 2, y diez hojas de aspecto saludable, sin evidencia de síntomas de enfermedad fueron coleccionadas de cada uno. El material fue y transportado al laboratorio en bolsas de polietileno estériles y procesadas dentro de las primeras 24 a 48 horas de colección. En el sitio 3, el número de

árboles evaluados estuvo limitado a la disponibilidad del hospedante en el área, por lo que 8 árboles fueron utilizados.

### ***Aislamiento de Endofitos Fúngicos***

Las hojas coleccionadas fueron lavadas con agua estéril y esterilizadas superficialmente por inmersión con la siguiente secuencia: 1 minuto en etanol 70 %, 2 min en una solución de lavandina al 4% (solución madre 5,5 g Cl/L), 30 segundos en etanol 50%. Luego de este proceso, 5 fragmentos (0,25 cm<sup>2</sup>) por hoja fueron transferidos a cajas de Petri de 9 cm de diámetro, que contenían extracto de malta agarizado (MEA) sin utilización de antibióticos. Las cajas se incubaron a 24° C por 6 semanas y fueron examinadas periódicamente. Todo fragmento de micelio emergente fue aislado y transferido a cajas de Petri con MEA para la obtención de cepas puras. Las cepas obtenidas en cultivo axénico se preservaron a 4° C hasta su estudio.

### ***Identificación fúngica***

Todos los aislamientos fueron repicados en Extracto de malta agarizado (MEA) o en Agar Papa Glucosado (APG). Los cultivos puros fueron examinados periódicamente hasta observar su esporulación hasta 30 días desde su siembra.

Las observaciones y las mediciones fueron llevadas a cabo de material fresco y montado en agua destilada, 5% de KOH o Floxina para microscopia óptica y en el reactivo de Melzer para observar reacción amiloide. Todas las estructuras micromorfológicas

fueron observadas en microscopio estereoscópico Boeco BTB-3A (Alemania) y medidas con un aumento de 1000X en microscopio binocular Zeiss Axioskop (Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Olympus modelo C-5060 Wide Zoom 5,1 megapíxeles (Tokio, Japón).

Las muestras para microscopía de epifluorescencia (EFM) fueron preparadas en 0,05% de calco-flúor. Las cepas consideradas relevantes fueron preservadas en la colección de cultivo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (BAFCcult).

En los casos de cepas estériles, estas fueron cultivadas a 24° C con un ciclo de 12 horas de luz UV no esterilizante, para inducir la esporulación. Los cultivos que no produjeron esporulación dentro de los 40 días de incubación fueron designados como Micelio Estéril.

### *Análisis de Datos*

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

$$F = \frac{n^{\circ} \text{ de aislamientos del taxon } A}{n^{\circ} \text{ de aislamientos de cada especie}} \times 100$$

La abundancia de aislamientos de las familias identificadas fue calculada como:

$$\sum_i^j n^{\circ} \text{ de familias } i \text{ aisladas}$$

$j$  = sitio muestreado

La diversidad de endofitos 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.

En el caso del índice de Simpson ( $D$ ) se calculó de la siguiente manera:

$$D = \frac{\sum n (n - 1)}{N (N - 1)}$$

donde:

$n$  = al número de individuos cada especie

$N$  = número total de individuos de cada especies

Para las comparaciones de entre sitios se utilizó la inversa de Simpson (D) calculada como:

$$D = \frac{1}{D}$$

Para los análisis de biodiversidad se realizaron curvas de acumulación de especies para estimar la potencia del muestreo. Con el empleo de EstimateS v.8.2 (Colwell, R. K. 2005. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>) se calcularon los estimadores de riqueza los cuales se dividieron en 2 grupos para una mejor visualización de los gráficos sin responder a una clasificación particular de los mismos en, Estimadores 1: ACE, ICE, Chao1, Chao2 y Estimadores 2: Jack1, Jack2, Bootstraps, MMRuns mean and MMMeans, además se calculó el índice de diversidad Alpha de Fisher. Para todos los índices de riqueza usados se evaluó su estabilidad contra el número de muestras colectadas.

El índice de similitud entre sitios fue calculado utilizando la fórmula de Sørensen's para determinar la similitud en la ocurrencia de especies. El rango de valores de similitud es 0 a 1 (0 indicando que no existe similitud, 1 indicando que la similitud es muy alta).

Este fue calculado usando la siguiente formula:

$$S' = \frac{2C}{(A + B)}$$

donde S' es el grado de similitud

A y B son el número de especies fúngicas en el hospedante, en el sitio A y B respectivamente y C es el número de especies común a ambos sitios.

### *Análisis Estadístico*

A partir de los datos de diversidad de Shannon, de Simpson, de índice de Riqueza e índice de Equitatividad, calculados para los arboles evaluados en cada sitio, se realizó un análisis estadístico de Anova de un factor para cada variable. Para los análisis se utilizó software analítico Statistica (2004 ).

Para no utilizar los valores crudos de riqueza (r) obtenidos directamente, y debido a que este valor muestra diferencia entre los sitios, se procedió a calcular un índice de Riqueza (R) para mitigar estas diferencias, por lo que se procedió a calcular el índice de Riqueza (R) de la siguiente manera:

$$R = \log_2 r$$

El índice de Riqueza es igual al logaritmo en base 2 de r. Donde r es la riqueza de cada hospedante.

La Equitatividad se refiere al grado de igualdad en la distribución de las especies en una comunidad por lo que una alta Equitatividad se consigue cuando todas las especies en la comunidad tienen proporciones iguales.

El índice de Equitatividad se calculó de siguiente manera:

$$Eq = \frac{H'}{R}$$

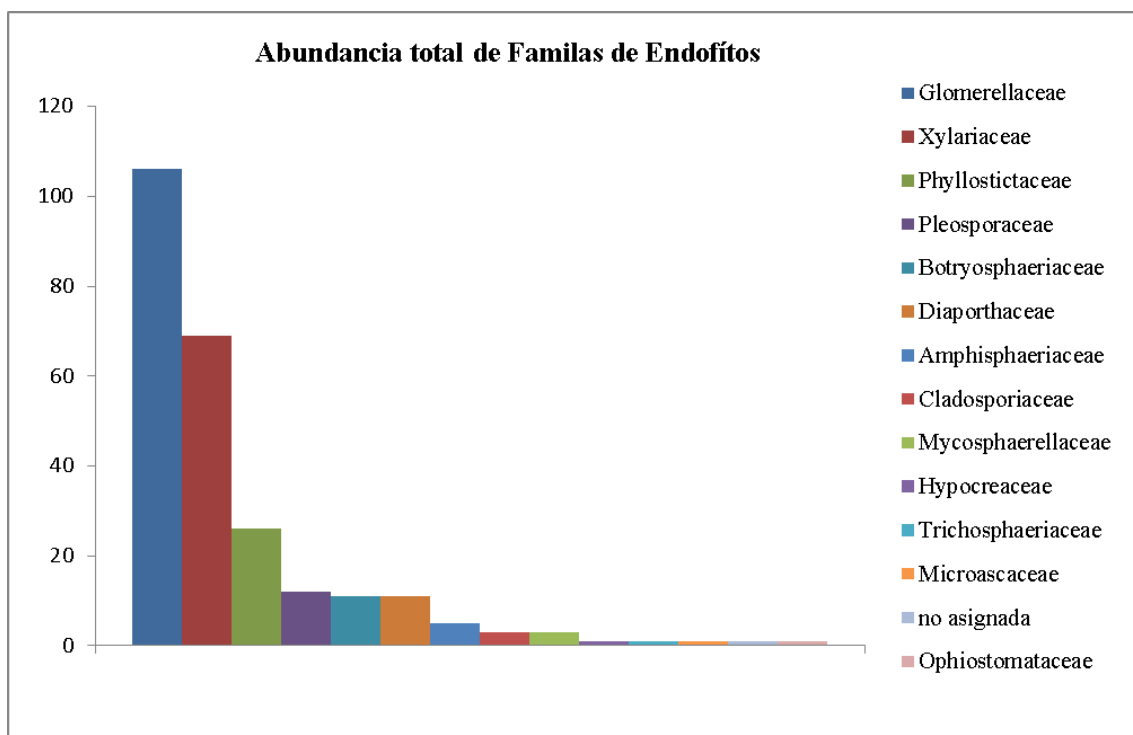
Donde H' es el índice de Shannon y R es el índice de Riqueza.

## Resultados

### *Análisis de la Diversidad Endofítica*

En este estudio se analizaron un total de 1800 fragmentos a partir de los cuales se obtuvieron de 565 aislamientos en la búsqueda de endofitos fúngicos, representando una recuperación de 31,4 % sobre la totalidad de los segmentos evaluados. La identificación taxonómica de los aislamientos obtenidos de los tres sitios en conjunto, reveló un total de 18 taxas distintas (Fig. 1.3), distribuidos en 14 familias (Fig. 1.2) Dentro de esta categoría, las 3 familias más abundantes fueron: Glomerellaceae, Xylariaceae y Phyllostictaceae, en orden decreciente de aislamientos.

En todos los sitios evaluados un gran porcentaje de los endofitos fúngicos aislados no produjeron conidios o estructuras de reproducción en los medios de cultivo, y/o bajo condiciones de radiación UV, haciendo muy dificultosa su identificación.



**Fig. 1.2** Gráfico de abundancia de familias de hongos endofíticas aislados a partir de todos los sitios muestreados.



### Sitio 1: *Reserva Natural Punta Lara*

Del total de 500 fragmentos evaluados se obtuvieron 245 aislamientos de endofitos (49% de los fragmentos). Estos aislamientos se agruparon en 55 morfotipos los que fueron asignados a 13 taxas distintas (Fig. 1.3). Las especies de endofitos fúngicos que presentaron mayor frecuencia fueron: *Colletotrichum* sp (26,93 %), *Xylaria* sp Hill ex Schrank (26,53 %) *Fusicoccum aesculi* Corda (2,86 %) (Tabla 1). Mientras que los endofitos con menores valores de frecuencia fueron: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (0,41%), *Diplodia pseudoseriata* C.A. Pérez, Blanchette, Slippers & M.J. Wingf. (0,41%), *Pestalotiopsis stevensonii* (Peck) Nag Raj (0,41%), *Petriella sordida*(Zukal) G.L. Barron & J.C. Gilman (0.41%), y *Sporothrix schenckii* Hektoen & C.F. Perkins, (0.41%).

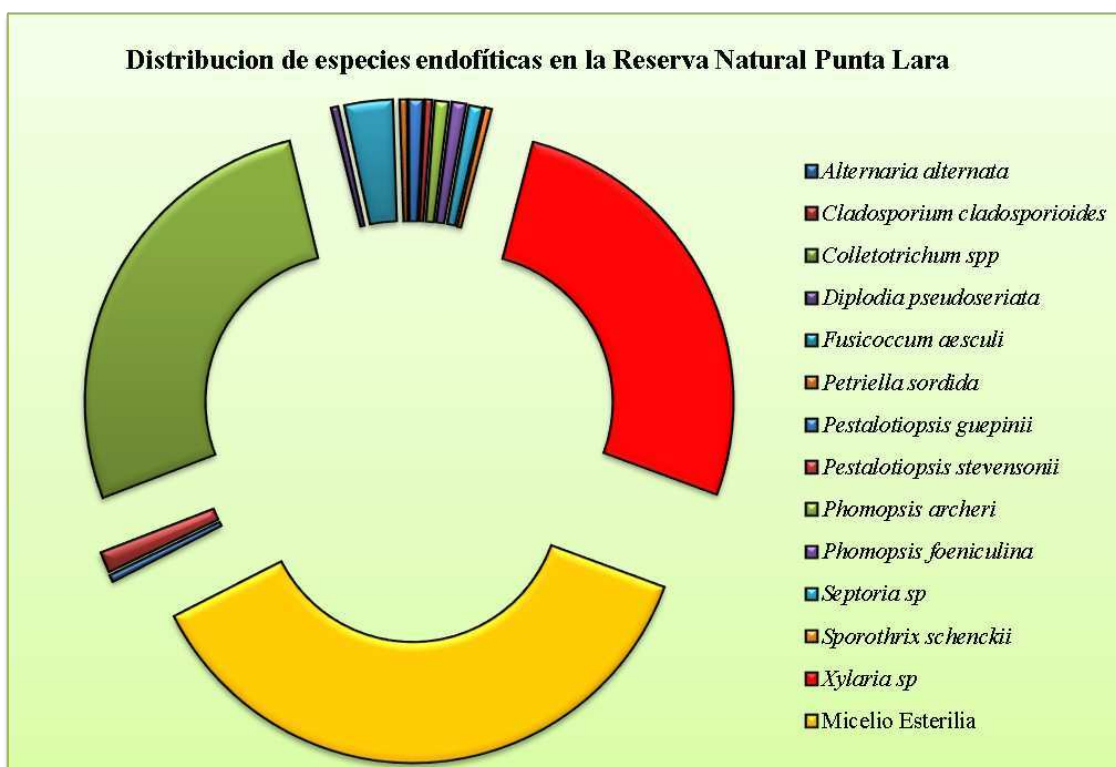


Fig. 1.3. Frecuencia relativas de aislamientos de endofitos fúngicos en el sitio 1 (Reserva Ecológica Costanera Norte) a partir de la especie arbórea *Blepharocalyx salicifolius*.

Sitio 2: *Reserva Ecológica Costanera Norte*

A partir de los 500 fragmentos evaluados en este sitio se obtuvieron 165 aislamientos (33% de los fragmentos). Estos fueron agrupados en 10 morfotipos y posteriormente asignados a 8 taxa. Los taxa que presentaron las frecuencias más altas fueron *Colletotrichum spp* (21,82 %), *Phomopsis archeri* B. Sutton (2,42%), and *Alternaria alternata* (1,82 %), mientras que los taxones con frecuencias bajas fueron *Acremonium sp* Link, (0,61%), *F. aesculi* (0,61%) y *Septoria sp* Sacc. (0,61%).

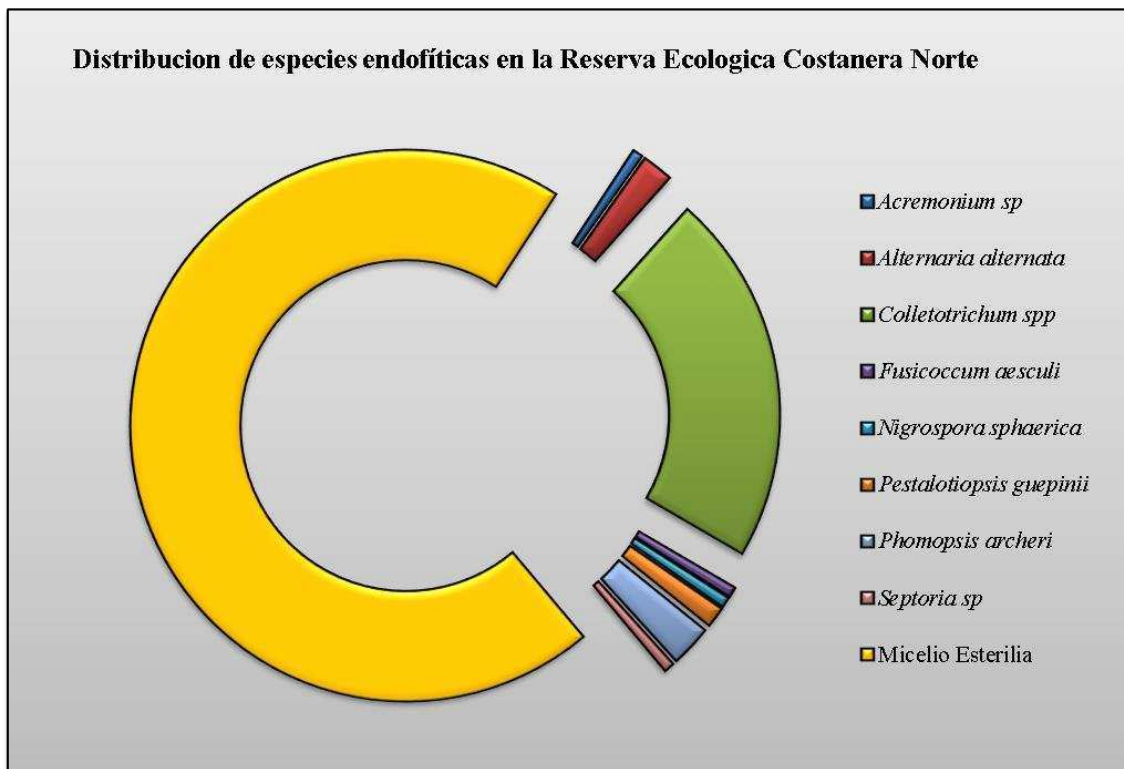


Fig. 1.4 Frecuencia relativa de aislamientos de endofitos fúngicos en el sitio 2 (Reserva Ecológica Costanera Norte) a partir de la especie arbórea *Blepharocalyx salicifolius*.

### Sitio 3: *San Antonio de Areco*

De los 400 fragmentos evaluados en este sitio se obtuvieron 39 aislamientos (9,75% de los fragmentos). Estos fueron agrupados en 6 morfotipos y se identificaron 5 especies. El género *Phyllosticta* fue el más abundante en este sitio, dentro del cual se reconocieron 2 especies: *Phyllosticta sphaeropsoidea* (Ellis & Everhart) y *Phyllosticta spinarum* (Nag Raj & M. Morelet). Las especies que presentaron mayor frecuencia de aislamientos fueron *P. spinarum* (20,51%), *Alternaria alternata* (12,82 %) and *Phomopsis archeri* (5,13 %), mientras que las especies con bajas frecuencias fueron *F. aesculi* (2,56%) y *P. sphaeropsoidea* (2,56 %) (Tabla 1).

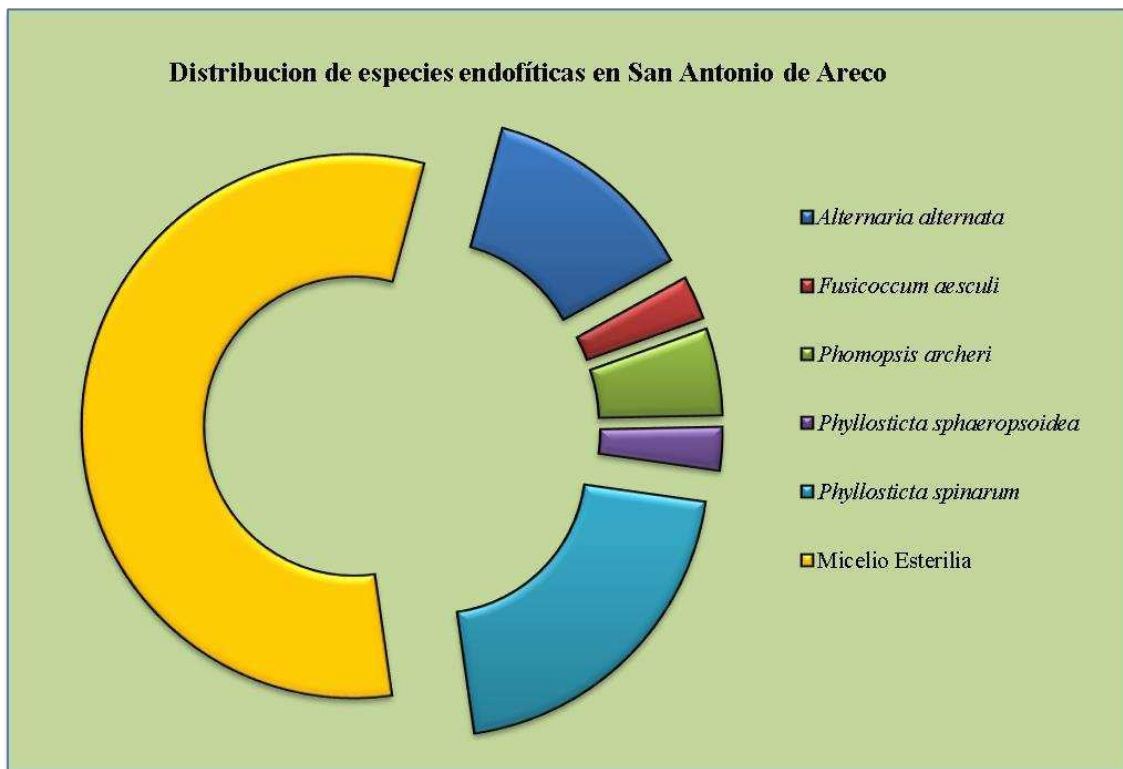


Fig. 1.5 Frecuencia relativa de aislamientos de endofitos fúngicos en el sitio 3 (San Antonio de Areco) a partir de la especie arbórea *Blepharocalyx salicifolius*.

Considerando el total de taxones aislados, cabe remarcar que sólo 3 especies fueron encontradas en todos los sitios evaluados en esta tesis, *A. alternata*, *F. aesculi* y *Phomopsis archeri*. En los sitios 1 y 2, áreas protegidas asociadas al Río de la Plata, las especies en común fueron: *A. alternata*, *Colletotrichum musae*, *F. aesculi*, *P. archeri*, *P. guepinii* and *Septoria* sp. En estas 2 áreas, el taxón más frecuente que aparece en ambos sitios fue *Colletotrichum* en sus formas teleomorfa y anamorfa dentro de este género dos especies fueron identificadas morfológicamente como: *Colletotrichum boninense* y *Colletotrichum* sp. Ambos anamorfos fueron encontrados en el sitio 1, mientras que cepas identificadas como *Colletotrichum*. sp sólo fueron aisladas en el sitio 2.

La mayoría de las especies registradas en este trabajo han sido previamente reportadas como endófitos foliares, con excepción de *Petriella sordida* la cual fue aislada en el sitio 1.

Mediante el programa EstimateS se analizó el comportamiento de diferentes estimadores de riqueza para todos los sitios evaluados. Además se calcularon las curvas de acumulación de especies para cada sitio muestreado con sus intervalos de confianza (95%) para evaluar el grado de esfuerzo de muestreo alcanzado (Fig. 1.6-1.8) y los índices de diversidad de Shannon, Simpson y Alpha de Fisher.

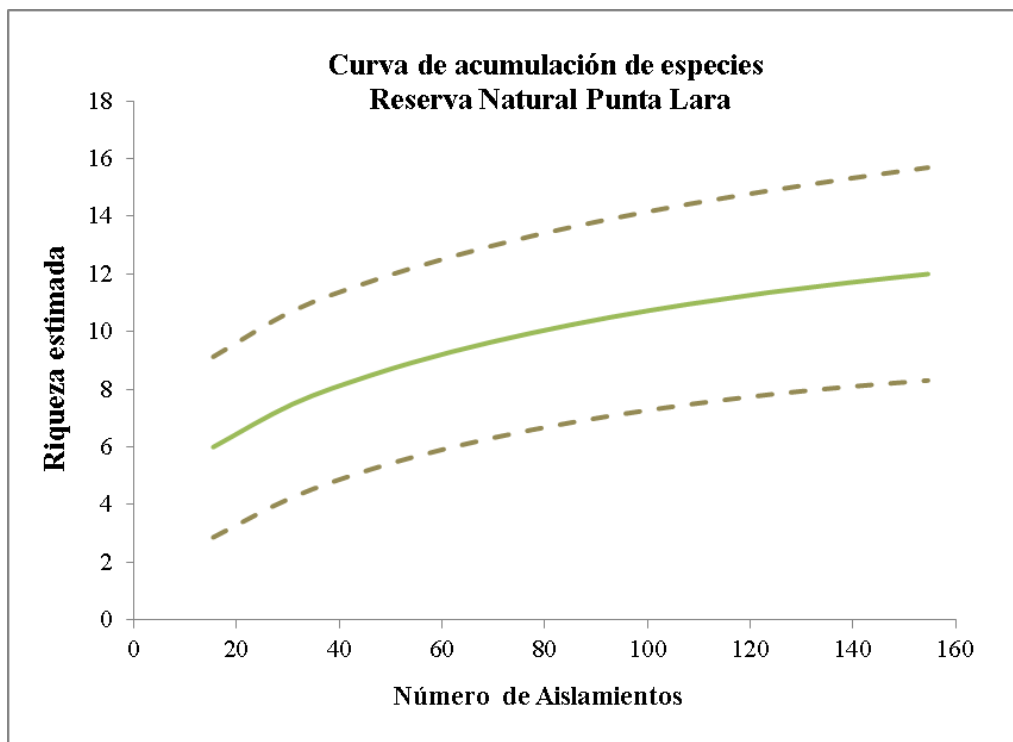
Las curvas de acumulación de especies para los 3 sitios muestran que a pesar del esfuerzo de muestreo realizado, en ninguno de los sitios se logra alcanzar la asíntota para el número de especies. Sin embargo cuando se analizan los 3 sitios juntos se observa que el sitio 1 es el que se acerca más a la asíntota (Fig. 1.9).

En el análisis del comportamiento de los diferentes estimadores de riqueza, los Estimadores 1 mostraron que los índices de riqueza más sensibles al esfuerzo de muestreo fueron Chao2 e ICE para los sitios 1 y 2, y ACE e ICE para el sitio 3, mientras

que los más estables al esfuerzo de muestreo resultaron ser ACE y Chao1 para los sitio 1 y 2, y Chao1 y Chao2 para el sitio 3 (Fig. 1.10, 1.12 y 1.14).

Los Estimadores 2 indican que los índices de riqueza más sensibles fueron MMRuns y MMMeans y siendo los más estables Jack1, Jack2 y Bootstrap para los sitios 1 y 3, por otro lado para el sitio 2 la mayoría de los estimadores de riqueza se mantuvieron estables a excepción de MMRuns (Fig. 1.11, 1.13 y 1.15). Del análisis realizado hasta aquí, se desprende que los índices ACE y Jack1 serían los más indicados para poder estimar la riqueza de especies para los sitios estudiados, dado que de los Estimadores 1 el índice ACE fue el que mejor se comportó en los 3 sitios, mientras que de los Estimadores 2 fue el índice Jack1, siendo estos 2 últimos poco afectados por el esfuerzo de muestreo (Fig. 1.10, 1.11, 1.12, 1.13, 1.14, y 1.15).

#### *Curvas de Acumulación de especies*



**Fig. 1.6** Curva de acumulación de especie endofíticas para el sitio 1(Reserva Natural Punta Lara). Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza (95 %).

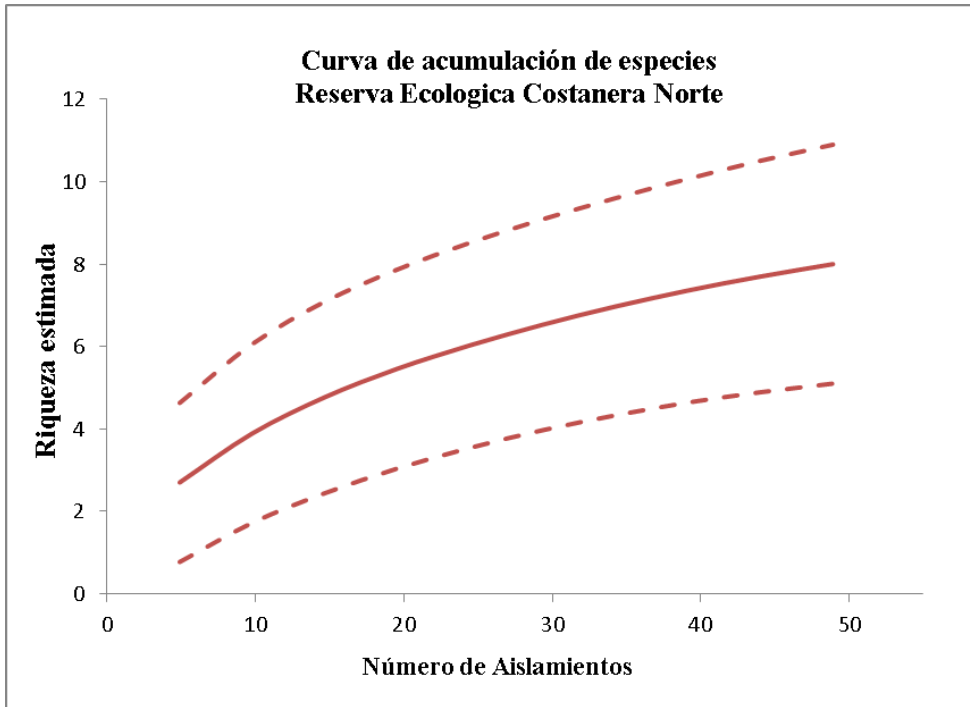


Fig. 1.7 Curva de acumulación de especie endofíticas para el sitio 2 (Reserva Ecológica Costanera Norte). Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza (95 %).

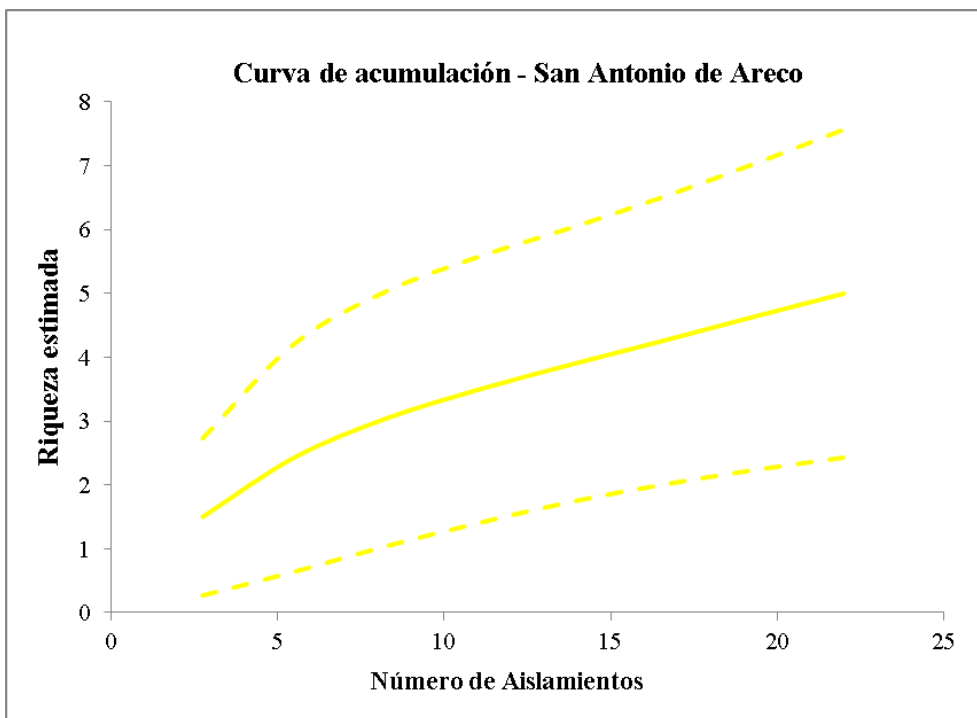


Fig. 1.8 Curva de acumulación de especie endofíticas para el sitio 3 (San Antonio de Areco). Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza (95 %).

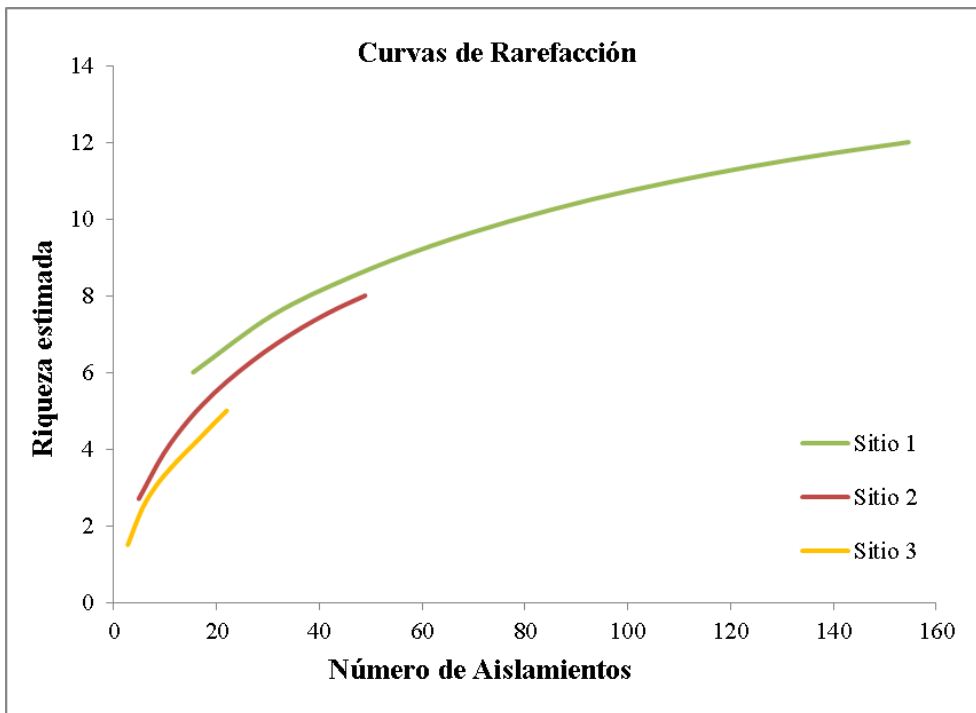
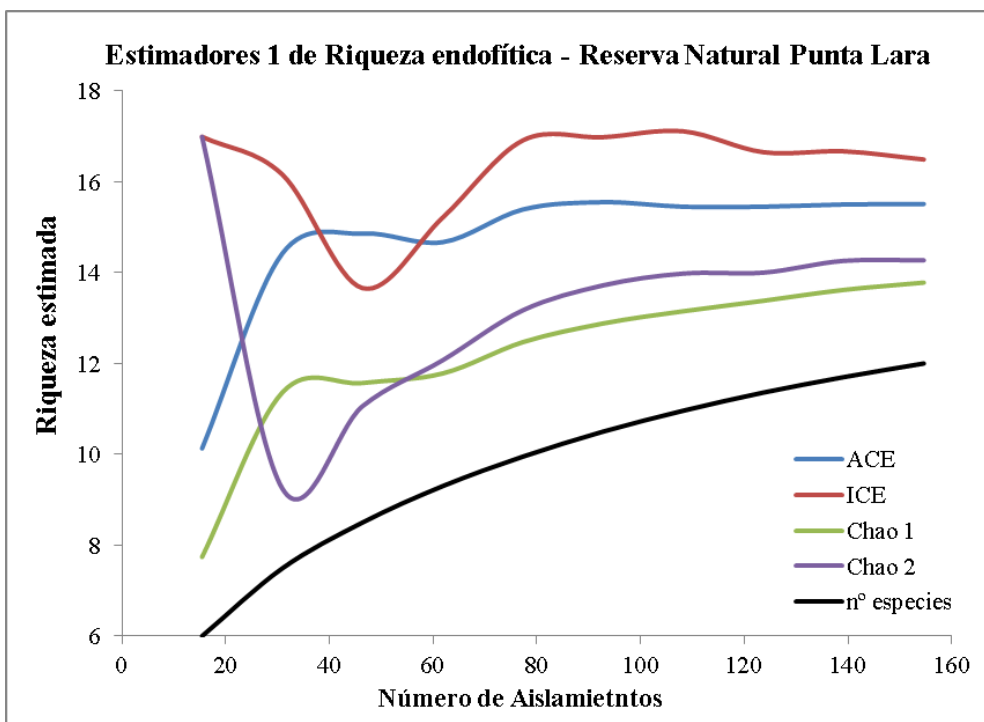
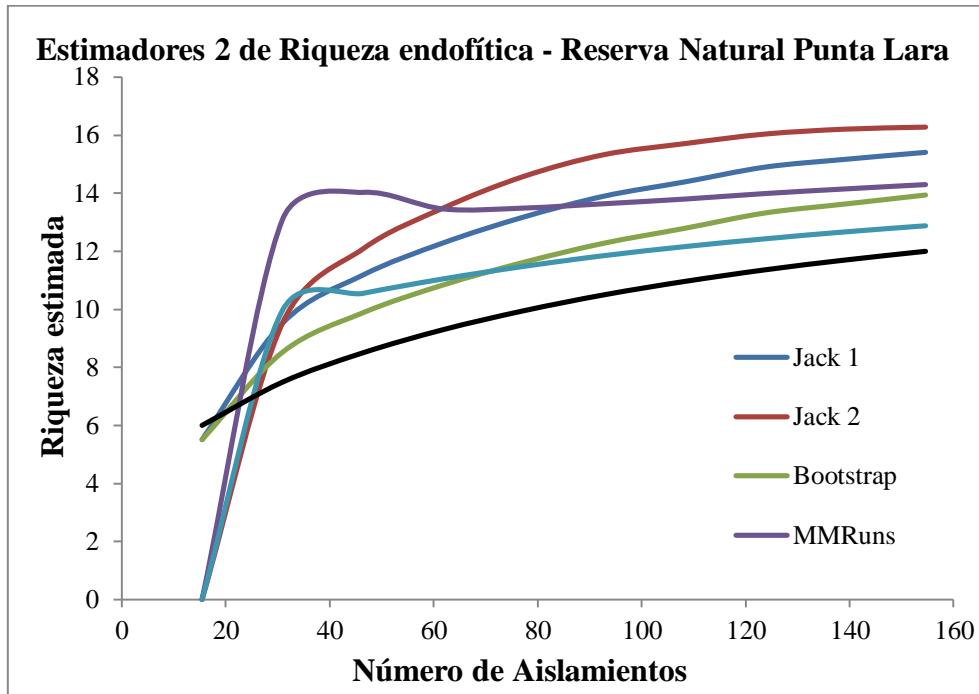


Fig. 1.9 Curva de acumulación de especies. Riqueza esperada de endofitos para los 3 sitios.

*Estimación de la riqueza fúngica*



**Fig. 1.10** Comportamiento de los Estimadores 1 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio 1. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).



**Fig. 1.11** Comportamiento de los Estimadores 2 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio 1. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).



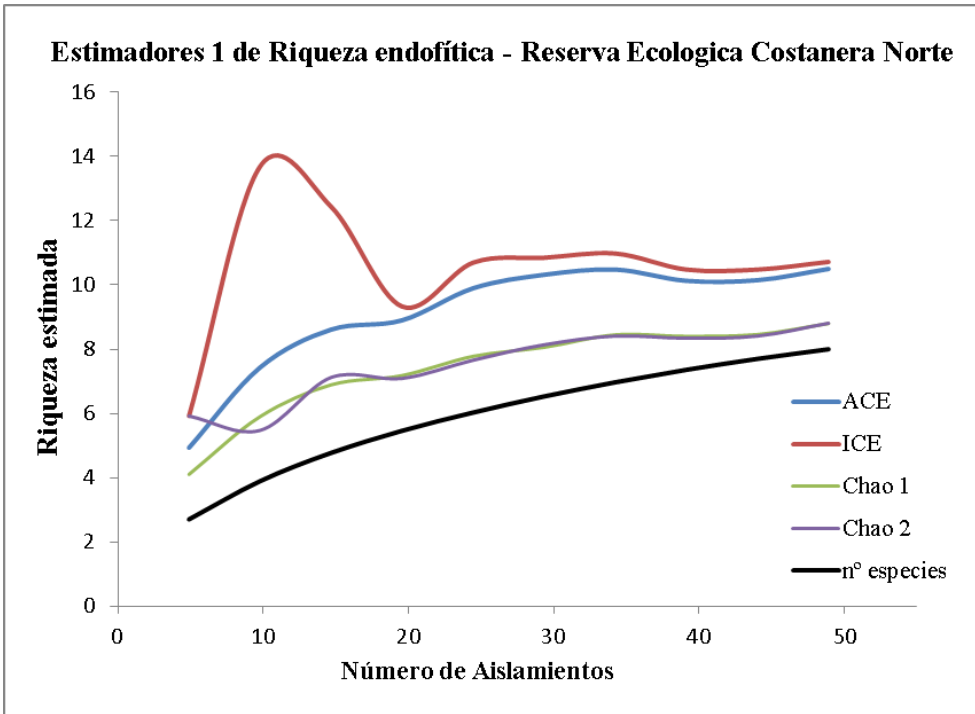


Fig. 1.12 Comportamiento de los Estimadores 1 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio 2. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).

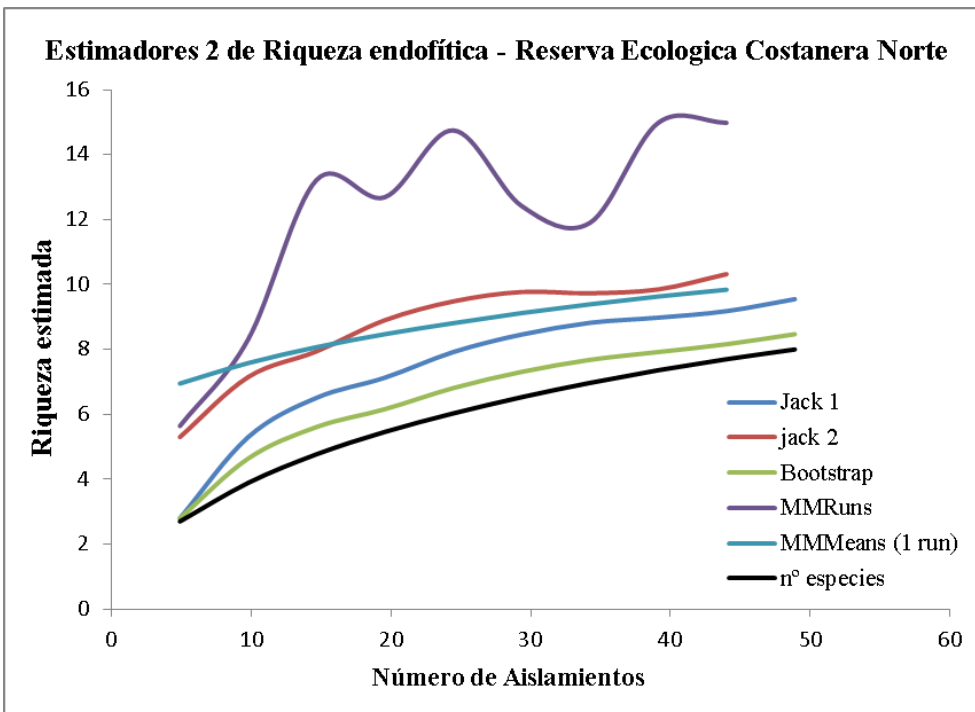


Fig. 1.13 Comportamiento de los Estimadores 2 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio 2. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).

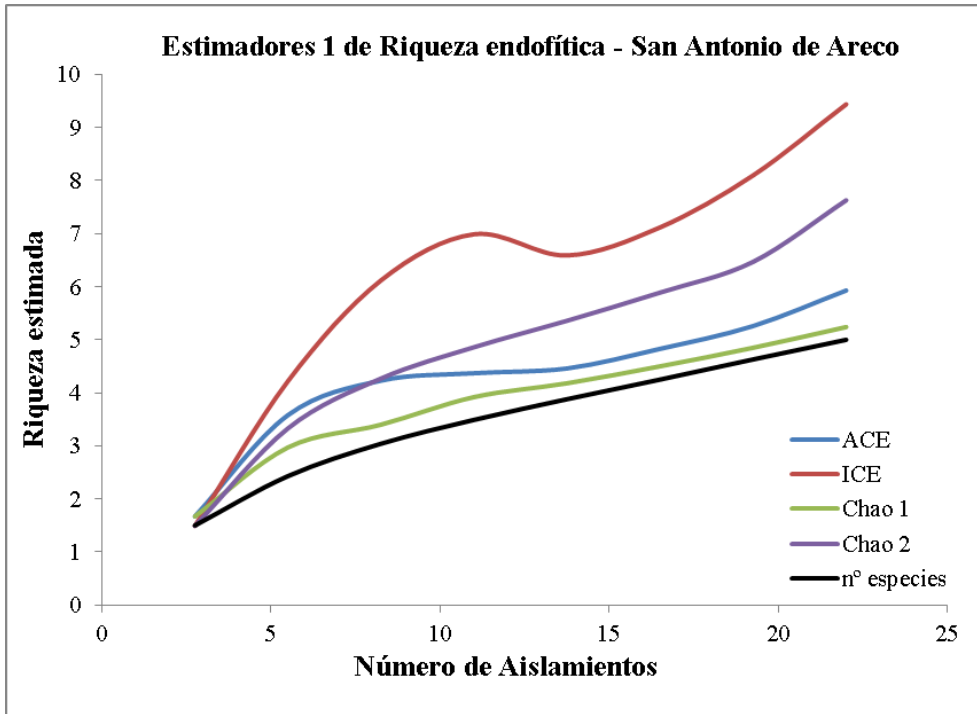


Fig. 1.14 Comportamiento de los Estimadores 1 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio 3. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).

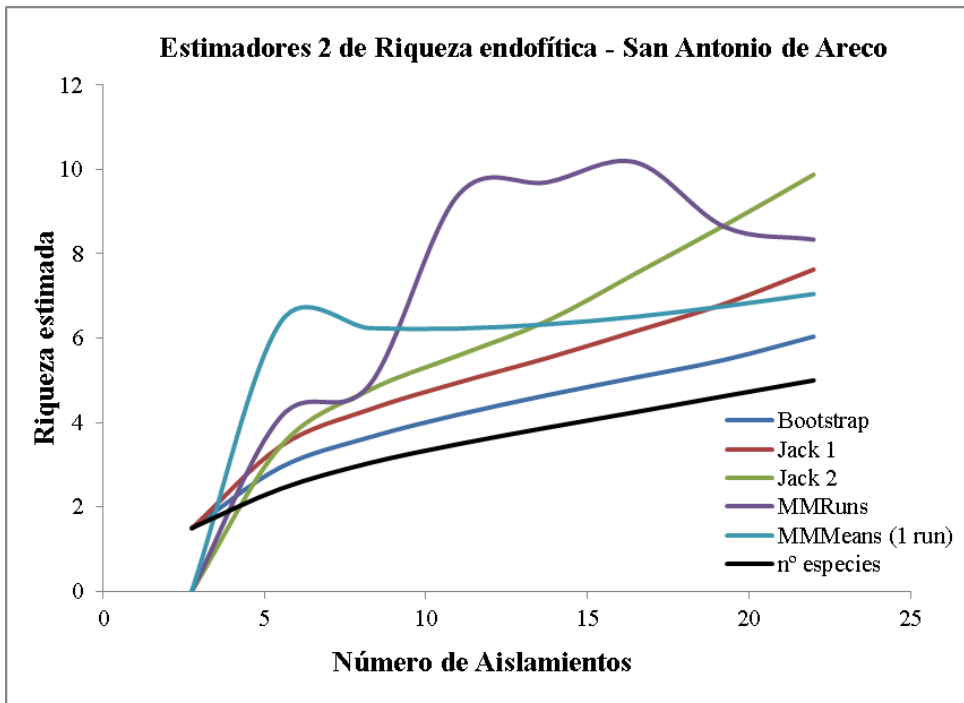


Fig. 1.15 Comportamiento de los Estimadores 2 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio 3. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).

### Estimación de la Diversidad fúngica

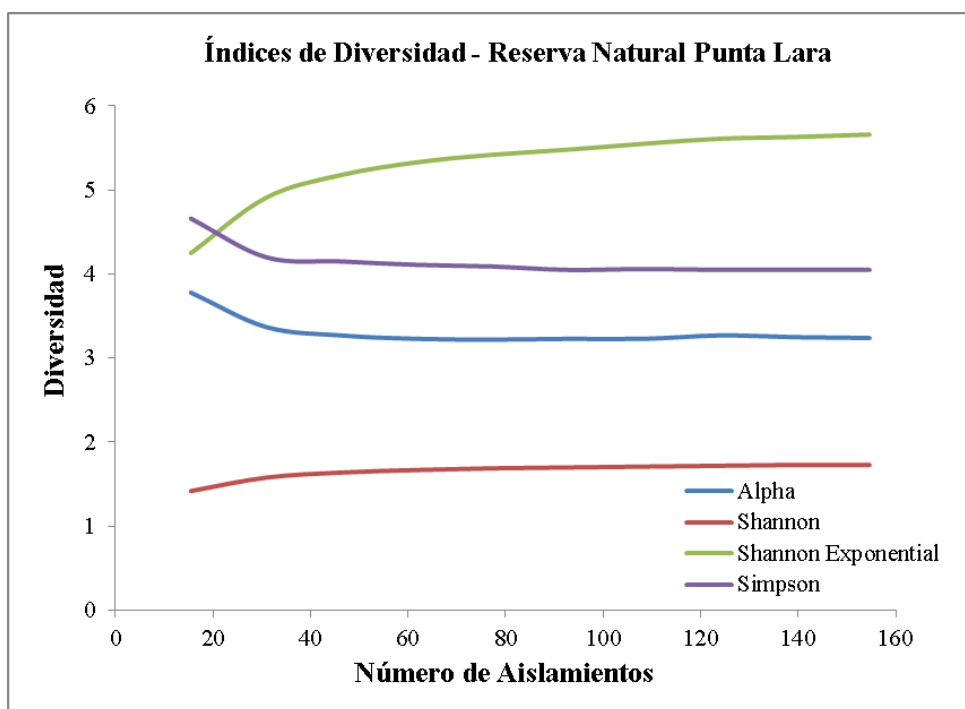


Fig. 1.16 Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio 1.

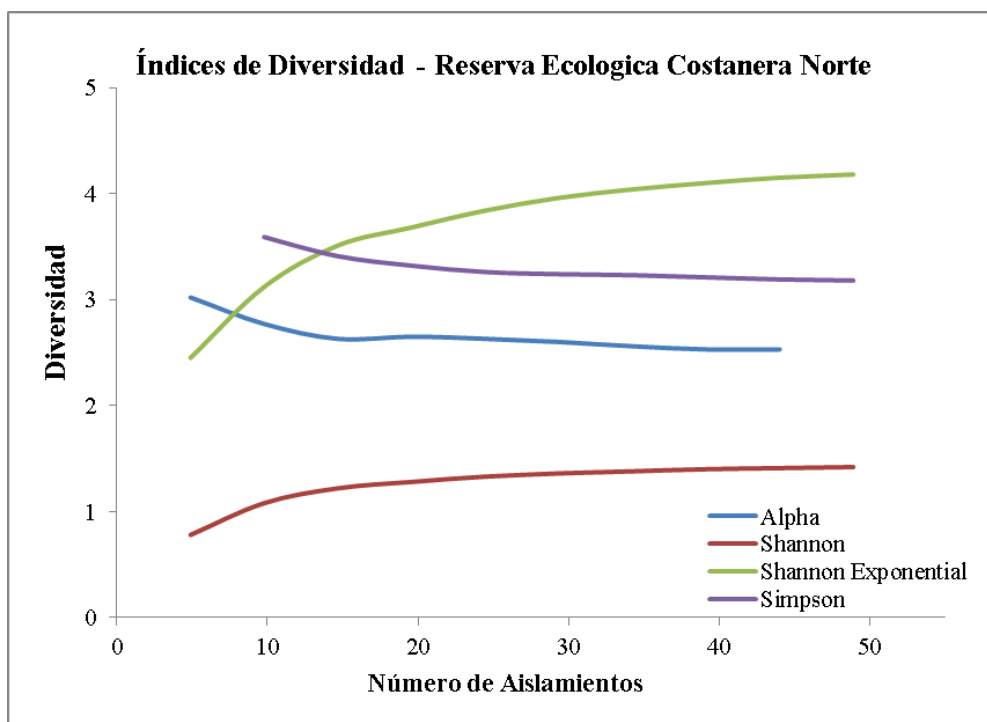
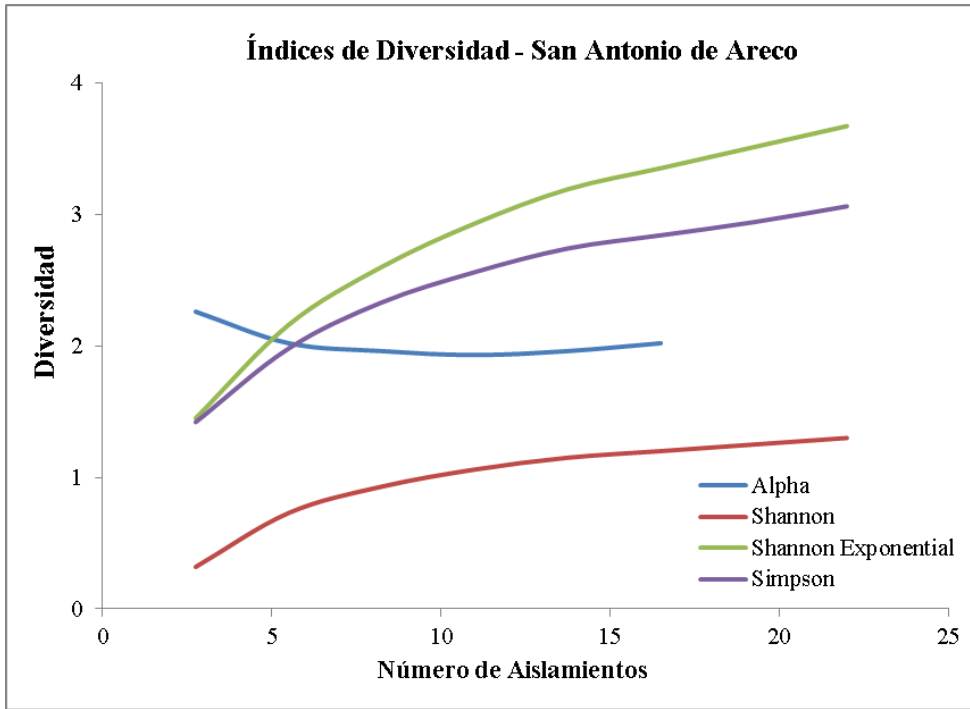


Fig. 1.17 Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio 2.



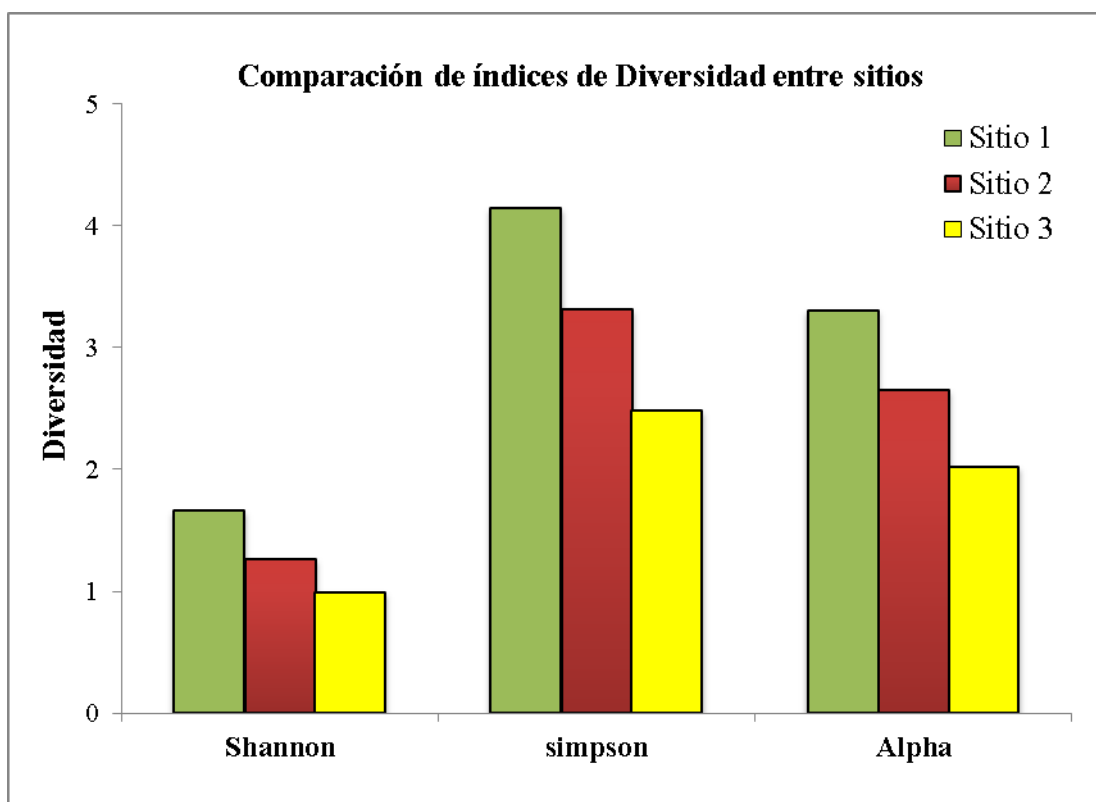
**Fig. 1.18** Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio 3.

A continuación se presentan los valores de los índices de diversidad obtenidos (Tabla 1.1) y se graficaron los mismos para una mejor visualización entre sitios (Fig. 1.19).

**Tabla 1.1 Comparación de índices de biodiversidad de los sitios evaluados.**

Sitios	Indice	Valores
Natural Reserva Punta Lara (sitio 1)	r	13
	Alpha	3,31
	Shannon	1,66
	Simpson (D)*	4,15
	Sorensen (sitio 1-2)	0,61
	Sorensen (sitio 1-3)	0,32
Reserva Ecológica Costanera Norte (sitio 2)	r	8
	Alpha	2,66
	Shannon	1,27
	Simpson (D)	3,31
	Sorensen (sitio 2-3)	0,43
San Antonio de Areco (sitio 3)	r	5
	Alpha	2,02
	Shannon	0,99
	Simpson	2,5

Se muestran los valores de diversidad para los 3 sitios evaluados. (\*)D representa la inversa de Simpson, r: riqueza observada.



**Fig. 1.19** Comparación de diferentes índices de diversidad entre 3 sitios.

El índice de Simpson fue de 4,15 para el sitio 1, y más bajo para los otros sitios manteniéndose una diferencia similar entre ellos (3,31 para el sitio 2 y 2,5 para el sitio 3).

El índice de similitud de Sorensen entre los sitios 1 y 2, fue mayor que los obtenidos entre los sitios 2 y 3, y que entre los sitios 1 y 3. Indicando que los sitios 1 y 2 serían más similares entre sí y que el sitio 1 tendría menos semejanza con el sitio 3, que cuando se comparan los sitios 2 y 3 (Tabla 1.1). Es interesante mencionar los taxones más predominantes pertenecen a los géneros *Colletotrichum* sp, *Phyllosticta* sp y *Xylaria* sp (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2. Lista de las especies fúngicas endofíticas aisladas.**

Taxones	Hospedante: <i>Blepharocalyx salicifolius</i>		
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
<i>Acremonium sp</i>	-	0,61	-
<i>Alternaria alternata</i>	0,41	1,82	12,82
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,23	-	-
<i>Colletotrichum sp</i>	27,05	21,82	-
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	0,41	-	-
<i>Fusicoccum aesculi</i>	2,87	0,61	2,56
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	0,61	-
<i>Petriella sordida</i>	0,41	-	-
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	0,82	1,21	-
<i>Pestalotiopsis stevensonii</i>	0,41	-	-
<i>Phomopsis archeri</i>	0,82	2,42	5,13
<i>Phomopsis foeniculina</i>	0,82	-	-
<i>Phyllosticta sphaeropsoidea</i>	-	-	2,56
<i>Phyllosticta spinarum</i>	-	-	20,51
<i>Polybulbophiale palmicola</i>	-	-	-
<i>Septoria sp</i>	0,82	0,61	-
<i>Sporothrix schenckii</i>	0,41	-	-
<i>Xylaria sp</i>	26,64	-	-
Micelio Esterilia	36,89	70,30	56,41

Taxones aislados en los 3 sitios muestreados. Valores expresados en porcentaje (%). Sitio 1 = Reserva Natural Punta Lara; Sitio2 = Reserva Ecológica Costanera Norte; Sitio 3 = San Antonio de Areco. Valores expresados en porcentaje. Se remarcan las 3 especies comunes a los 3 sitios.

*Colletotrichum gloeosporioides* es usualmente reconocida como el anamorfo de *Glomerella cingulata* (Sutton, 1980; Wan Gyu Kim et al. 2000; Palmucci and Wolcan 2005; Hyde et al. 2009). Sin embargo, otros estados anamorficos también se han reportado relacionados con este teleomorfo como *C. musae* y *C. orbiculare* (Sutton 1980; Hyde et al. 2009). La fase sexual, determinada como *Glomerella cingulata* fue encontrada en los sitios 1 y 2. Uno de los taxones más abundantes en ambos sitios fue *Colletotrichum* spp, con dos especies registradas como: *Colletotrichum* sp y *C. boninense*. En el sitio 1 las cepas de *Colletotrichum* Corda encontradas fueron identificadas como *Colletotrichum* sp y *C. boninense*, mientras que en el sitio 2, solo se encontró *Colletotrichum* sp.



## *Análisis estadísticos*

### *Significancia de los índices de diversidad descriptivos de la comunidad endofítica foliar*

Considerando los resultados obtenidos de riqueza y las diferencias en los índices de diversidad que indican una tendencia de disminución en los sitios con mayor modificación, se decidió evaluar el grado de diferencia entre los índices de diversidad encontrados en el capítulo 1, para ello se realizó un Anova de 1 factor para evaluar si las diferencias observadas eran significativas.

### *Análisis de los índices de diversidad de Simpson y Shannon.*

Tablas del análisis del índice de Simpson.

**Tabla 1.3. Análisis de la varianza de 1 factores para el índice de diversidad de Simpson.**

Sitios	Media de Simpson	Error estándar	Simpson -95%	Simpson +95%	N
1	4,147000	0,102895	3,935084	4,358916	10
2	3,314000	0,102895	3,102084	3,525916	10
3	2,483750	0,115040	2,246821	2,720679	8

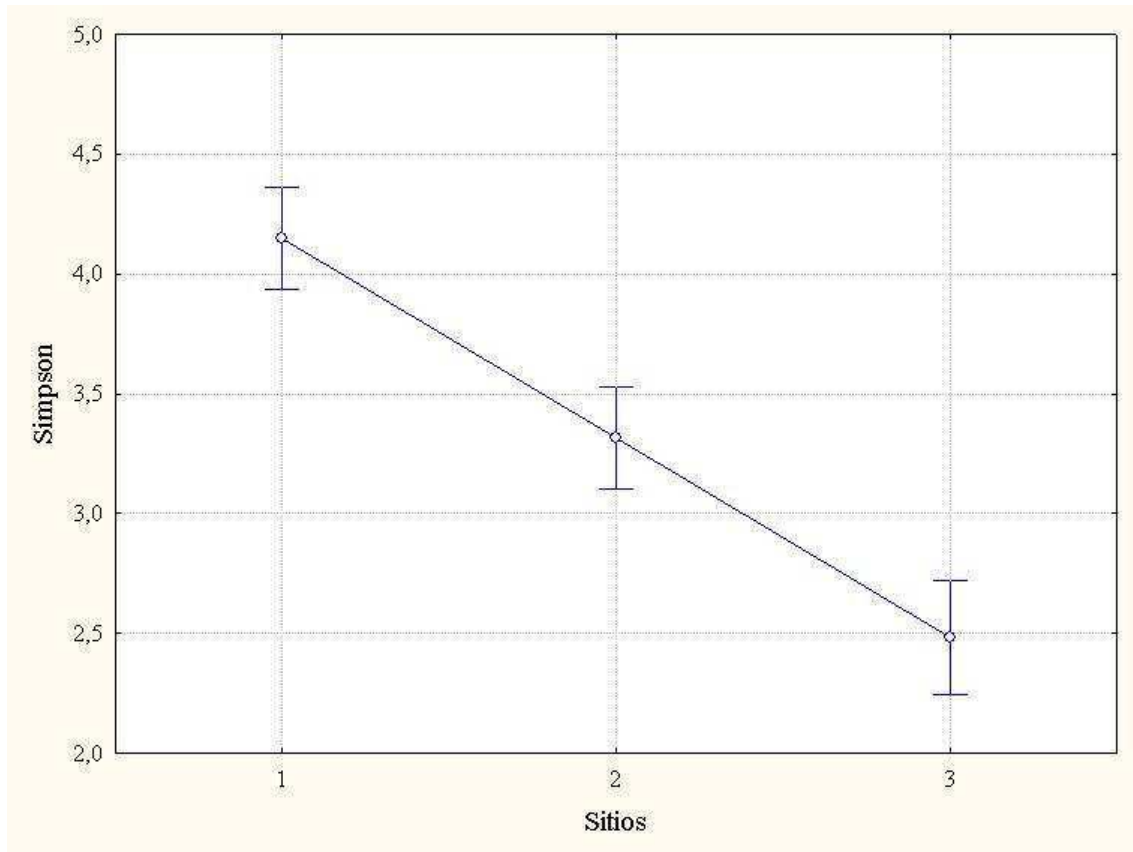
Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	304,3017	1	304,3017	2874,201	0,000000
Sitios	12,3516	2	6,1758	58,332	0,000000
Error	2,6468	25	0,1059		

**Análisis de la varianza de un factor, índice de Simpson: significativo para todos los sitios.**

**Tabla 1.4. Análisis de contraste a partir del Anova de 1 factor del índice de Simpson.**

test de Tukey HSD; índice de Simpson			
Probabilidades aproximadas para los test post hoc			
Error: entre SM= 0,10587, df = 25,00			
Sitios	(1)	(2)	(3)
	4,147	3,314	2,4837
1		0,000144	0,000132
2	0,000144		0,000164
3	0,000132	0,000164	

Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.



**Fig. 1.20 Grafico de comparativo de la diversidad de Simpson entre sitios.**

El análisis de los datos por ANOVA resultó significativo ( $p < 0,05$ ) para el factor considerado, sugiriendo que existen diferencias en cuanto a los valores de diversidad de Simpson obtenidos para todos los sitios (Tabla 1.3). El análisis de contraste de Tukey

corroborar lo obtenido en el Anova para las distintas combinaciones entre los sitios, indicando que todos los sitios serían distintos en cuanto a la diversidad con valores de significancia semejantes (Tabla 1.4).

Tablas del análisis del índice de Shannon ( $H'$ ).

**Tabla 1.5. Análisis de la varianza de 1 factores para el índice de diversidad de Shannon.**

Sitios	Media de Shannon	Error estándar	Shannon -95%	Shannon +95%	N
1	1,659	0,069	1,516	1,802	10
2	1,266	0,069	1,123	1,409	10
3	0,993	0,078	0,833	1,152	8

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	47,22094	1	47,22094	981,5774	0,000000
Sitios	2,03453	2	1,01727	21,1458	0,000004
Error	1,20268	25	0,04811		

**Análisis de la varianza de un factor, índice de Shannon: significativo para todos los sitios.**

**Tabla 1.6. Análisis de contraste a partir del Anova de un factor del índice de Shannon.**

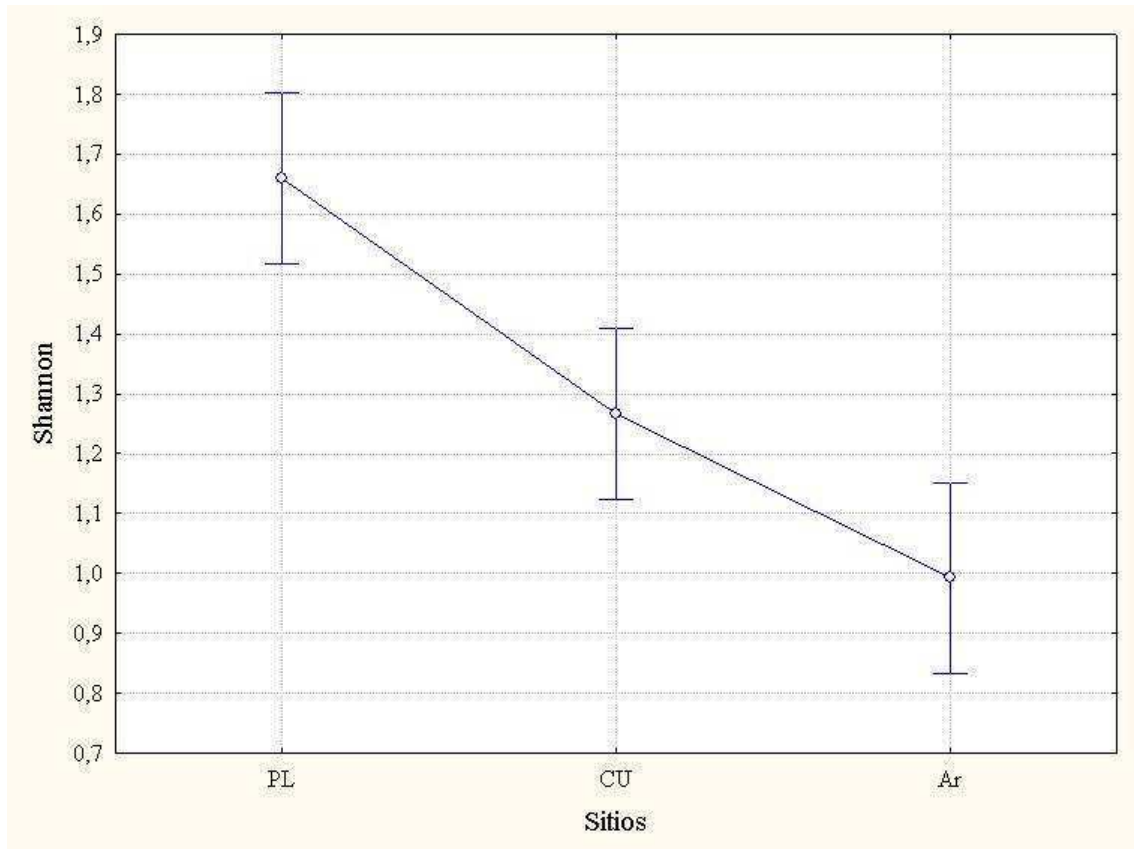
test de Tukey HSD ; índice de Shannon  
 Probabilidades aproximadas para los test post hoc  
 Error: entre SM= 0,04811, df= 25,000

	(1)	(2)	(3)
Sitios	1,659	1,266	0,9925
1		0,001472	0,000134
2	0,001472		0,037250
3	0,000134	0,037250	

**Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.**

El análisis de los datos por ANOVA de un factor para el índice de diversidad de Shannon resultó significativo ( $p < 0,05$ ), sugiriendo que existen diferencias en cuanto a los valores de diversidad de Shannon obtenidos para todos los sitios evaluados. El análisis de contraste de Tukey corrobora lo obtenido en el Anova para las distintas

combinaciones entre sitios, indicando que todos los sitios serían distintos en cuanto a la diversidad (Tabla 1.5-6 y Fig. 1.21). Dentro de la significancia de los valores, sin embargo, los sitio 2 y 3 son menos significantes que entre el sitio 1 y 2, y aún más diferente serían los sitios 1 y 3.



**Fig. 1.21. Gráfico de comparación de la diversidad de Shannon entre sitios.**

Considerando que los análisis de los índices de diversidad de Shannon y Simpson a través del valor de  $p$  indican que todos los sitios evaluados serían significativamente distintos entre sí, se procedió al análisis las distintas componentes de la diversidad, la Riqueza y la Equitatividad, tratándose los datos de la misma manera que con los índices de diversidad, realizando un Anova de 1 factor y un contraste por el test de Tukey.

*Análisis de los índices de Riqueza y Equitatividad a partir del índice de Shannon*

Tablas de los análisis del índice de Riqueza (R)

**Tabla 1.7. Análisis de la varianza de 1 factores para el índice de Riqueza.**

Sitios	Media de índice de Riqueza (R)	Error estándar	índice de Riqueza (R) - 95%	índice de Riqueza (R) +95%	N
1	3,259510	0,147554	2,955617	3,563403	10
2	2,502058	0,147554	2,198165	2,805951	10
3	1,731210	0,164970	1,391447	2,070972	8
Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	172,7438	1	172,7438	793,4161	0,000000
Sitios	10,4202	2	5,2101	23,9302	0,000002
Error	5,4430	25	0,2177		

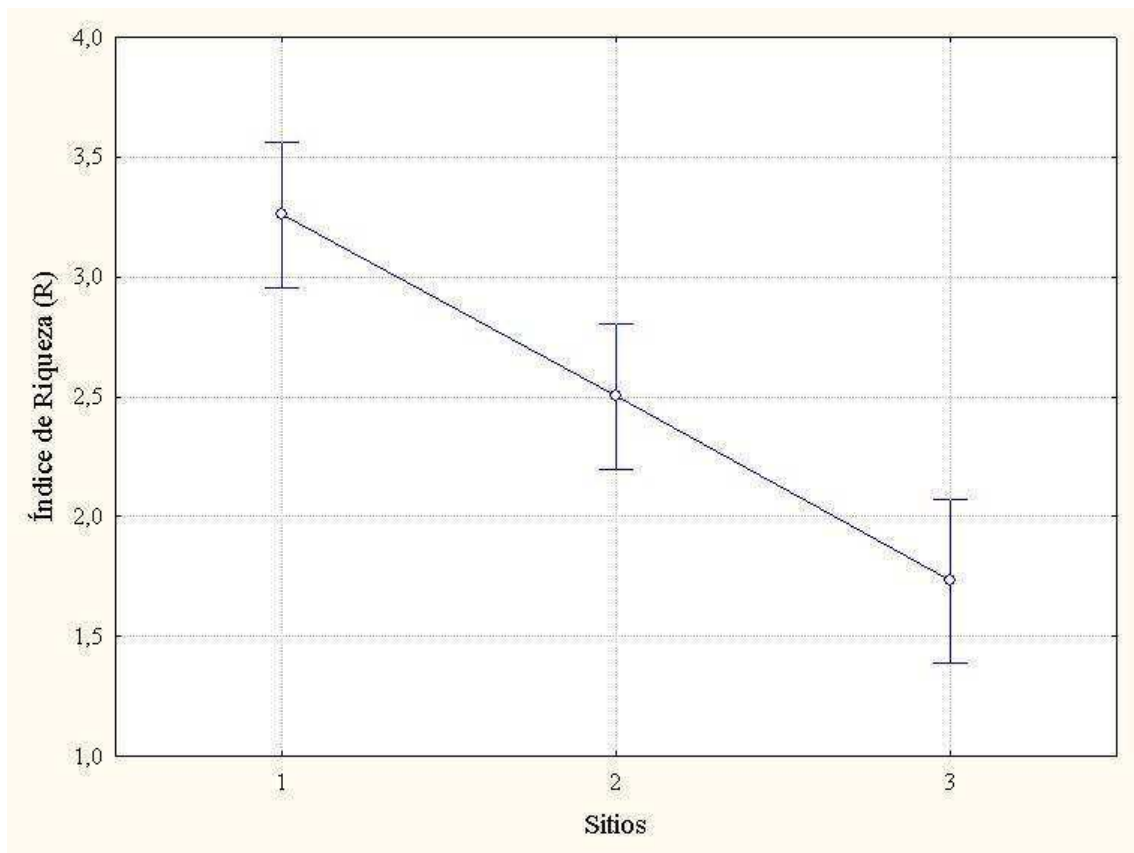
**Análisis de la varianza de un factor, índice de Riqueza: significativo para todos los sitios.**

**Tabla 1.8. Análisis de contraste a partir del Anova de 1 factor del índice de Riqueza.**

test de Tukey HSD; índice de Riqueza (R)			
Probabilidades aproximadas para los test post hoc			
Error: entre SM= 0,21772, df = 25,00			
Sitios	(1)	(2)	(3)
1	3,2595	0,00362	0,000132
2	0,00362	2,5021	0,005157
3	0,000132	0,005157	1,7312

**Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.**

El análisis de los datos por ANOVA de 1 factor resultó significativo ( $p < 0,05$ ) para el índice de Riqueza entre sitios, indicando que existirían diferencias en cuanto a los valores de Riqueza para todos los sitios (Tabla 1.7-.8 y Fig. 1.22). El test de Tukey corrobora las diferencias encontradas para las distintas combinaciones de los sitios.



**Fig. 1.22.** Gráfico de comparación de los índices de Riqueza para los 3 sitios evaluados.

Tablas del análisis del índice de Equitatividad.

**Tabla 1.9. Análisis de la varianza de 1 factores para el índice de Equitatividad.**

Sitios	Media de Equitatividad (H'/R)	Error estándar	Equitatividad (H'/R) -95%	Equitatividad (H'/R) +95%	N
1	0,511	0,007	0,496	0,526	10
2	0,511	0,007	0,495	0,526	10
3	0,572	0,008	0,554	0,589	8

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	7,80982	1	7,80982	14151,18	0,000000
Sitios	0,02110	2	0,01055	19,12	0,000009
Error	0,01380	25	0,00055		

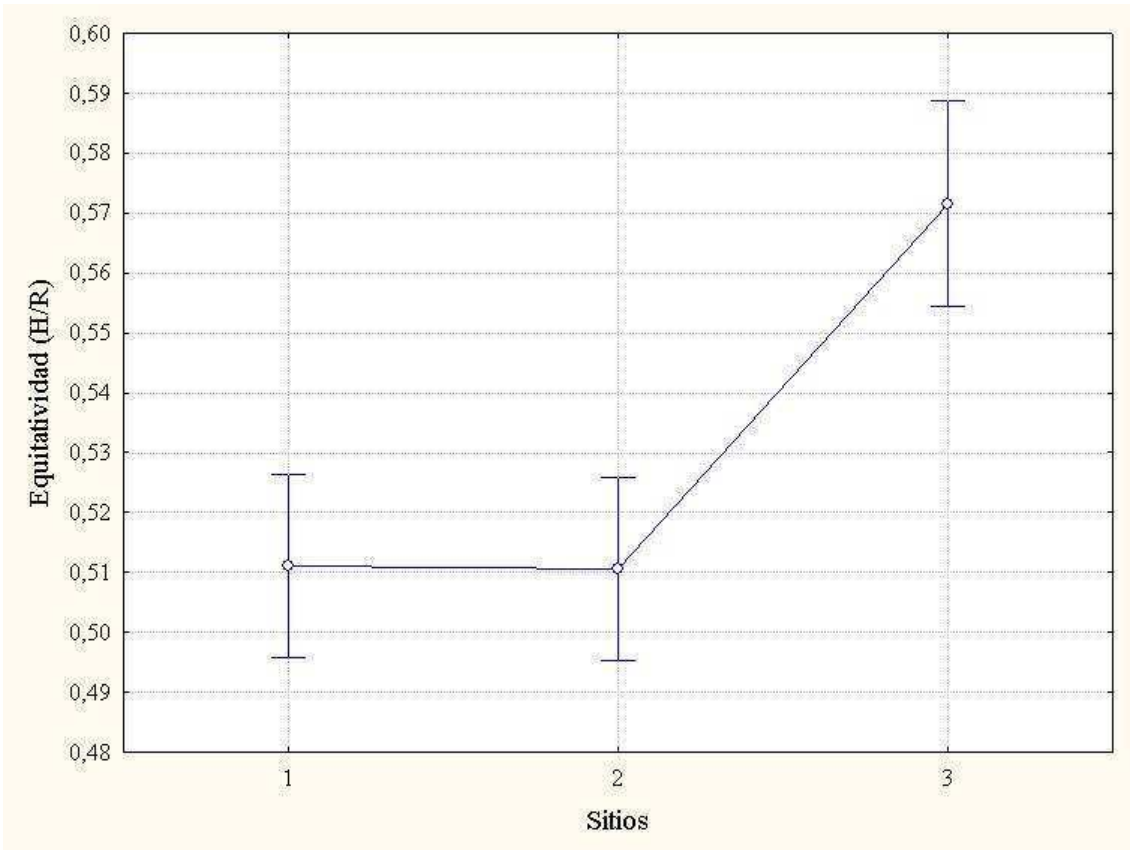
**Análisis de la varianza de un factor, índice de Equitatividad: significativo para todos los sitios.**

**Tabla 1.10. Análisis de contraste a partir del Anova de 1 factor del índice de Equitatividad.**

test de Tukey HSD; Equitatividad (H'/R)  
 Probabilidades aproximadas para los test post hoc  
 Error: entre SM= 0,00055, df = 25,00

	(1)	(2)	(3)
Sitios	0,51102	0,51058	0,57157
1		0,999097	0,00016
2	0,999097		0,000157
3	0,00016	0,000157	

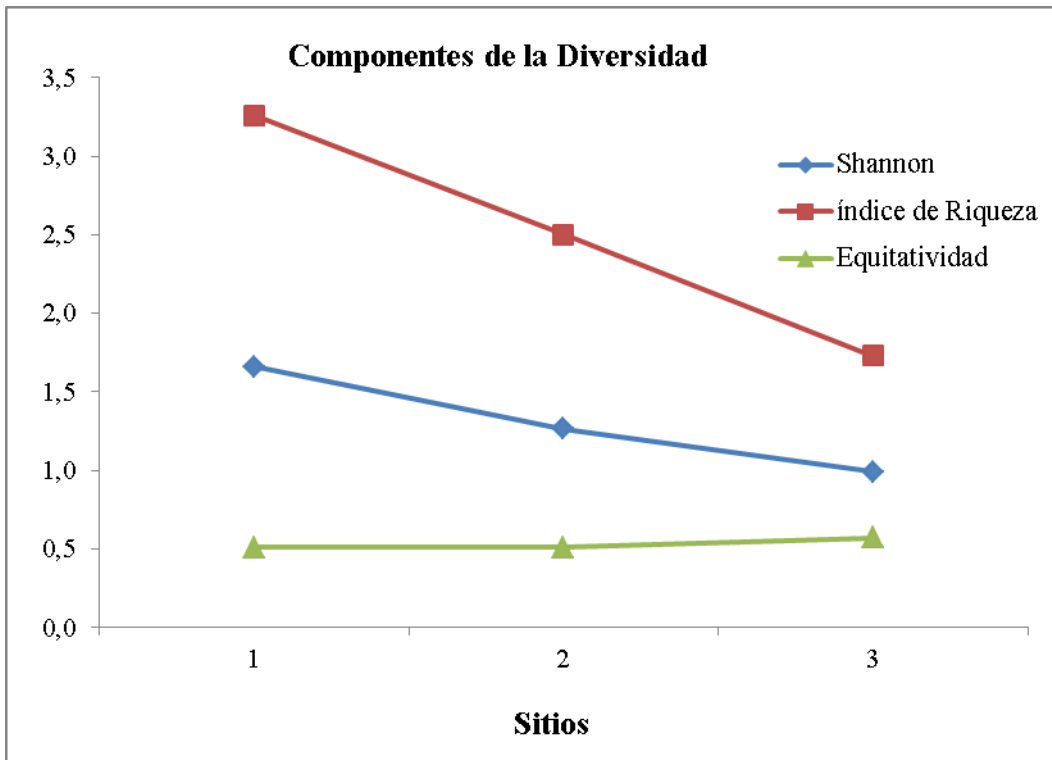
**Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.**



**Fig. 1.23. Gráfico del análisis del índice de Equitatividad para los 3 sitios evaluados.**

El análisis de los datos por ANOVA de 1 factor resultó significativo ( $p < 0,05$ ) para el índice de Equitatividad, indicando que existen diferencias en cuanto a la Equitatividad entre todos los sitios. El contraste realizado por el test de Tukey para los sitios 1 y 3, y entre los sitios 2 y 3 indica que hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre estas combinaciones de sitios corroborando el Anova. Sin embargo los resultados para la comparación de los sitios 1 y 2, dan un ( $p > 0,05$ ) señalando que no habría diferencia en cuanto a la Equitatividad de los sitios (Tabla 1.9-10 y Fig. 1.23). La figura 1.24 resume en el análisis de la diversidad y sus componentes, en el cual no se llega a apreciar las similitudes en Equitatividad entre los sitios 1 y 2, debido a la diferencia entre los valores, esta semejanza se puede apreciar en la figura 1.23





**Fig. 1.24.** Gráfico comparativo de la diversidad de Shannon y sus componentes, el índice de Riqueza y la Equitatividad para los 3 sitios evaluados.

*Descripciones y consideraciones taxonómicas sobre las especies encontradas.* A continuación se describen aquellas cepas que fueron seleccionadas para su posterior preservación en el BAFCCult.

### **Ascomicetes endofíticos**

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

Clase Dothideomycetes

Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

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

Colonias verde oliva a grisáceas oscuras. Conidióforos emergiendo solitarios o en pequeños grupos, simples o ramificados, castaño verde oscuros, lisos, 3-5 µm de ancho, con 1 o varias cicatrices por formación de conidios. Conidios de color pálido a castaño verdoso, formados en cadena, claviformes, lisos con numerosos septos transversales y longitudinalmente, hasta oblicuos, (9) 24 -46 (48) x 10-115 µm.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Reserva Ecológica Costanera Norte, 34°32'20"S, 58°26'36"O (Sitio 2), Provincia de Buenos, San Antonio de Areco 34°15'43"S 59°28'0"O, a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

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 (Larran et al. 2002; Novas y Carmarán

2008). En Argentina se lo ha citado como endofito en trigo (Larran et al. 2002), y endofito de *Broussonetia papyrifera* y *Ligustrum lucidum* (Novas y Carmarán 2008).

*Colletotrichum boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib., *Mycoscience* 44(1): 48 (2003).

Clase Sordariomycetes

Orden Incertae sedis

Familia Glomerellaceae

Descripción:

Colonias blancas a crema, a veces ligeramente grisáceas de micelio abundante en APG, reverso claro. Peritecios subglobosos a piriformes de color castaño oscuro, seta presente esporádicamente. Conidios hialinos, lisos, cilíndrico, (12) 14 -16 (19) x 6-7  $\mu\text{m}$ , conidios en masa color naranja a salmón.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: Este género es cosmopolita, apareciendo en muchos tipos de plantas (Damm et al. 2012). *Colletotrichum boninense* ha sido citada en numerosas oportunidades como endofito de hoja (Rojas et al. 2010). En Argentina no ha sido reportado previamente, por lo que es el primer registro de la especie para el país.

*Colletotrichum argentinensis* Español E. sp. nov.

Clase Sordariomycetes

Orden Incertae sedis

Familia Glomerellaceae

Etimología: referida a la ubicación geográfica de la especie.

Coloniae in APG cum mycelio aereo albae vel cremeae grisei, raro setosae; reversum cremeum; Sclerotia absentia; Appressoria circularis claviforme. Perithecium subglobosis vel pyriformes fusco-brunneo. Conidia hyalina, cylindrica, levis, 14 -17 x 5-6  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$ = 16,3 x 5,4  $\mu\text{m}$ , n=30), aseptata, recta, ad basim truncata, ad apicem obtusa, aurantiacis ad salmonum.

Descripción: Colonias en APG micelio aéreo blancos a crema con tonos grisáceos, seta generalmente ausente a escasas, reverso crema. Apresorio circular a claviforme Peritecios subglobosos a piriformes de color castaño oscuro. Conidios hialinos, cilíndrico, lisos, 14 -17 x 5-6  $\mu\text{m}$  ( $\bar{X}$ = 16,3 x 5,4  $\mu\text{m}$ , n=30) aceptado, rectos de base truncada y ápice obtuso color naranja a salmón.

Teleomorfo: no observado

Origen del material: ARGENTINA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Reserva Ecológica Costanera Norte, 34°32'20"S, 58°26'36"O (Sitio 2), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, (EE9, Holotipo EE8) Español E.

Notas: Esta descripción corresponde a las cepas 8 y 9 del presente trabajo.

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

Clase Dothideomycetes

Orden Capnodiales

Familia Cladosporiaceae

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

Colonias de color verde oliva o castaño oliváceo, con reverso en extracto de malta de color negro verdoso. Conidióforos micro y macronematosos, 2-5  $\mu\text{m}$  anchos, lisos o verrugosos. Conidios, en general lisos, elipsoidales o limoniformes, castaño-oliva pálido, 0-septados, en ocasiones con 1 septo, 4,5-8 (10) x 4-6  $\mu\text{m}$ .

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), aislado a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: El género *Cladosporium* es cosmopolita, ha sido encontrado en hojas, restos de plantas, madera y otros sustratos, es común aislarlo como contaminante del aire (Seifert et al., 2011). *Cladosporium cladosporioides* ha sido citado en numerosas oportunidades como endofito de hoja y corteza (Griffith y Boddy 1990; Fisher et al. 1994; Mahesh et al. 2005). Citado para la Argentina (Allegrucci et al. 2009).

*Diplodia pseudoseriata* C.A. Pérez, Blanchette, Slippers & M.J. Wingfield, 2009.

Clase Dothideomycetes

Orden *incertae sedis*

Familia Botryosphaeriaceae

Descripción:

Colonias de color verde castaño oliváceo, con reverso oscuro en extracto de malta.

Picnidios globosos oscuros. Conidios lisos, ovoide de base truncada , de color castaño a castaño oscuro, medidas (18) 20-26 (28) x (10) 11-12(14)  $\mu\text{m}$ .

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), aislado a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: la especie ha sido encontrado como endofito y como patógeno de distintas especies vegetales de Myrtaceae, y se encuentra ampliamente distribuida en los bosques de Mirtaceas de Uruguay.

*Fusicoccum aesculi* Corda (1829).

Clase Dothideomycetes

Orden Botryosphaerales

Familia Botryosphaeriaceae

Descripción:

Colonias de micelio abundante melanizado, de color grisáceo a negro, con reverso oscuro en extracto de malta. Picnidios globosos oscuros melanizados. Conidios lisos, hialinos, no septados, de pared delgada, fusiforme a subclaviformes con base ligeramente truncada, medidas (15) 17-21 x 6-7  $\mu\text{m}$ . presencia de microconidios de 2-4 x 5-8  $\mu\text{m}$ .

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), aislado a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: Actualmente más de 200 nombres están asociados a esta familia. Esta especie es el anamorfo de y ha sido reportada distribuida frecuentemente con Eucaliptus y Pinus, tanto como patógeno sobre diferentes hospedantes y como endofito (Slippers y Wingfield 2007).

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

Clase Sordariomycetes

Orden Xylariales

Familia Amphisphaeriaceae

Descripción:

Conidioma de hasta 200  $\mu$  diámetro. Conidióforos: 1-3 (4)  $\mu$ m ancho. Conidios: 20-28 x 7-8  $\mu$ m, lisos: células centrales concoloras, 13-16  $\mu$ m de largo: apéndices apicales 2-5, generalmente 3, sin ramificación, ápices obtusos, 10-20  $\mu$ m de largo; apéndice basal 2-5  $\mu$ m de largo.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Reserva Ecológica Costanera Norte, 34°32'20"S, 58°26'36"O (Sitio 2), Provincia de Buenos, San Antonio de Areco 34°15'43"S 59°28'0"O (sitio 3), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: *Pestalotiopsis* sp es comunes en ecosistemas templados y tropicales, como patógenos pueden causar enfermedades, aunque también se los ha encontrado como saprobios y endofitos (Maharachchikumbura et al. 2011). Citada anteriormente para la Argentina por Allegrucci et al. (2009).



*Pestalotiopsis stevensonii* (Peck) Nag Raj, *Coelomycetous Anamorphs with Appendage-bearing Conidia* (Ontario): 655 (1993)

Clase Sordariomycetes

Orden Xylariales

Familia Amphisphaeriaceae

Descripción:

Colonia castaña verdosa con tonos grisáceos, micelio poco abundante de revés oscuro, con tinción del medio tornándolo al ocre. Conidioma irregular en MEA. Conidios: 20-27 x 4-5  $\mu\text{m}$ , lisos: células centrales concoloras, 11-14  $\mu\text{m}$  de largo: apéndices apicales 2, sin ramificación, ápices obtusos, apéndice basal 2-4  $\mu\text{m}$  de largo.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: *Pestalotiopsis* sp es comunes en ecosistemas templados y tropicales, como patógenos pueden causar enfermedades, aunque también se los ha encontrado como saprobios y endofitos (Maharachchikumbura et al. 2011). Mientras que *P. stevensonii* ha sido registrada como patógeno sobre varias especies de *Pinus*. En Argentina no ha sido previamente reportada, por lo que es el primer registro de la especie para el país.

*Petriella sordida* (Zukal) G.L. Barron & J.C. Gilman, *Can. J. Bot.* 39: 839 (1961)

Subdivision: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Microascales

Familia: Microascaceae

Descripción:

Colonia oscura, micelio poco desarrollado o adherido al sustrato. Peritecios oscuros carbonosos, papilado a cuello largo con base esférica castaño oscuros de 300x400 µm cubierto por pelos septados y rectos de color oscuro. Asco subgloboso u ovoide, 24-26 x 12-14 µm. Ascosporas plano convexas de color castaño claro o dorado con pequeñas gutulas de aceite. Anamorfo no observado.

Origen de la cepa: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°47'11.07"S 58° 0'11.85"O (Sitio 1), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E. (BAFCcult 3966).

Notas: Este género pertenece al Orden Microascales y erigido por Curzi (1930). *Petriella sordida* no ha sido citada hasta el momento como endofito de hoja o pecíolo. Sin embargo, ha sido citado como coprófilo y productor de compuestos antifúngicos (Lee et al. 1995) y cercana filogenéticamente al género *Chaetomiun* (Lee y Hanlin 1999). En Argentina no ha sido previamente reportada, por lo que es el primer registro de la especie para el país.

*Phyllosticta sphaeropsidea* Ellis & Everh. [as 'sphaeropsidea'], Bull. Torrey bot. Club  
10(7): 97 (1883)

Clase Dothideomycetes

Orden Botryosphaeriales

Familia Phyllostictaceae

Descripción:

Colonia de color verde oscuro a gris oscuro o negra, de micelio poco abundante en ocasiones con formación anillos de crecimiento, de revés oscuro. Conidioma subgloboso a agregados. Conidios hialinos, aceptados, unicelulares cubiertos por una capa fina de mucilago, ovoide a elipsoidales, gutulados, de 12-16 x 9-11  $\mu\text{m}$ ; 1 apéndice apical de 8-16  $\mu\text{m}$ , estado espermacico no observado.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos, San Antonio de Areco 34°15'43"S 59°28'0"O (sitio 3), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: *Phyllosticta* es un importante género (teleomorfo *Guignardia aesculi* (Peck) V.B. Stewart, de hongos fitopatógenos conocido por causar mancha foliar y enfermedades en frutas en una amplia diversidad de hospedantes (van der Aa et al. 2002). *Phyllosticta sphaeropsidea* se han reportado como patógeno, pero no como endofito (Wikee et al. 2011). En Argentina no ha sido previamente reportada, por lo que es el primer registro de la especie para el país.

*Phyllosticta spinarum* (Died.) Nag Raj & M. Morelet, *Bull. Soc. Sci. nat. Arch. Toulon et du Var* 34(219): 12 (1978)

Clase Dothideomycetes

Orden Botryosphaeriales

Familia Phyllostictaceae

Descripción:

Colonia de color verde oscuro a negra, de micelio poco abundante en ocasiones con formación anillos de crecimiento, de revés oscuro. Conidioma subgloboso a agregados. Asco 8 esporado de 56-82  $\mu\text{m}$ , Ascoporas hialinas aseptadas de 14-16 x 5-6  $\mu\text{m}$ . Conidios hialinos, aceptados, unicelulares cubiertos por una capa fina de mucilago, ovoide a elipsoidales, gutulados, de 10-14 x 7  $\mu\text{m}$ ; 1 apéndice apical de 8-14  $\mu\text{m}$ , estado espermacico no observado.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos, San Antonio de Areco 34°15'43"S 59°28'0"O (sitio 3) y Provincia de Entre Ríos, Reserva Nacional El Palmar (sitio adic.), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: *Phyllosticta* es un importante género (teleomorfo *Guignardia* Viala & Ravaz) de hongos fitopatógenos conocido por causar mancha foliar y enfermedades en frutas en una amplia diversidad de hospedantes (van der Aa et al. 2002). *Phyllosticta* sp se han reportado como patógeno, endofitos y saprobios (Wikee et al. 2011). Citas previas de esta especie en Argentina ha sido reportada por (Stringari et al. 2009).

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

Clase Sordariomycetidae

Orden Diaporthales

Familia Diaporthaceae

Descripción:

Conidioma globoso o subgloboso. Conidióforos filiformes. Conidios,  $\alpha$ -conidios elipsoidales, 0-3 gutulados, de 8-11 x 3-4  $\mu\text{m}$ ;  $\beta$ -conidios filiformes, curvados en un extremo, (18) 20-31 x 1-1,5  $\mu\text{m}$ . La cepa estudiada presenta  $\beta$ -conidios ligeramente más largos que los descritos por Sutton (1980): 15-19  $\mu\text{m}$  de largo.

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Reserva Ecológica Costanera Norte, 34°32'20"S, 58°26'36"O (Sitio 2), Provincia de Buenos, San Antonio de Areco 34°15'43"S 59°28'0"O (sitio 3), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: *Phomopsis* es un importante género de hongos fitopatógenos con una amplia diversidad de hospedantes. Las especies de *Phomopsis* (Sacc.) Bubák se han reportado 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). Se lo ha reportado como endofito

sobre *Acer truncatum* (Sun et al. 2011). Citas previas de esta especie en Argentina ha sido reportada por Robles (2014).

*Phomopsis foeniculina* (Sacc.) Câmara

Clase Sordariomycetidae

Orden Diaporthales

Familia Diaporthaceae

Descripción:

Conidioma globoso o subgloboso. Conidióforos filiformes. Conidios,  $\alpha$ -conidios elipsoidales, 0-2 gutulados, de 6-7 x 3-4  $\mu\text{m}$ ;  $\beta$ -conidios filiformes, curvados en un extremo, (19) 23-30 x 1-1,5  $\mu\text{m}$ .

Origen del material: ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires, Reserva Natural Punta Lara, 34°49'00"S 57°58'00"O (Sitio 1), a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: *Phomopsis* es un importante género de hongos fitopatógenos con una amplia diversidad de hospedantes. Las especies de *Phomopsis* (Sacc.) Bubák se han reportado 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). Esta especie no ha sido reportada previamente, por lo que es el primer registro para Argentina.

*Polybulbophiale palmicola* Goh & K.D. Hyde, Mycotaxon 69: 148 (1998)

Subdivision: Pezizomycotina

Clase: Incertae sedis

Orden: Incertae sedis

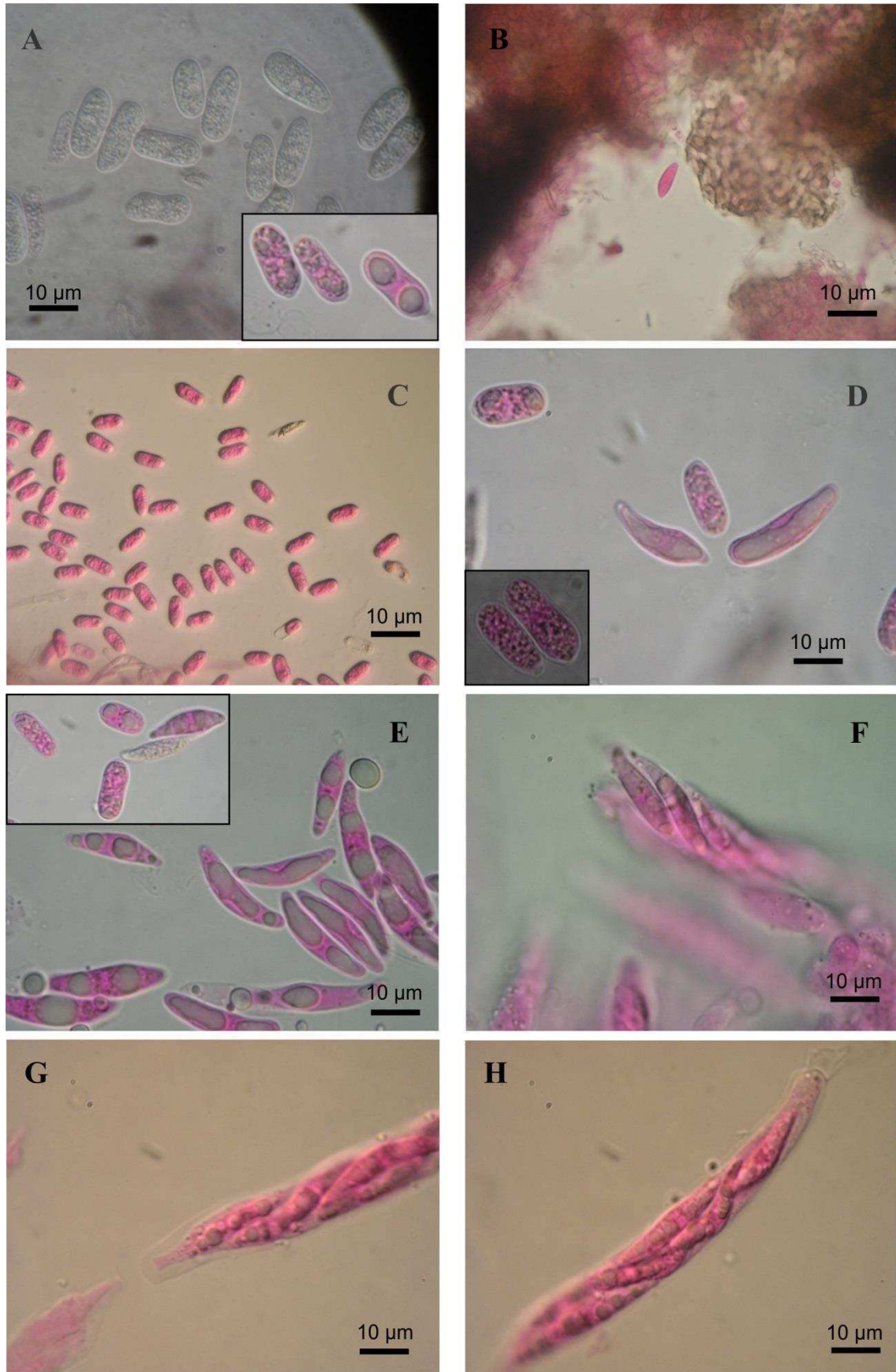
Familia: Incertae sedis

Descripción:

Colonias grisáceas a oscuras, estroma ausente Conidióforos emergiendo solitarios o en pequeños grupos, simples, rectos, sin ramificaciones, septados de color castaño a oscuros, lisos, 3-5  $\mu\text{m}$  de ancho. Conidios hialinos, solitarios, filiformes curvados a ligeramente curvados, afinándose en los extremos, lisos, con 1-3 septos transversales, (46) 51-54 (67) x 2-3  $\mu\text{m}$ .

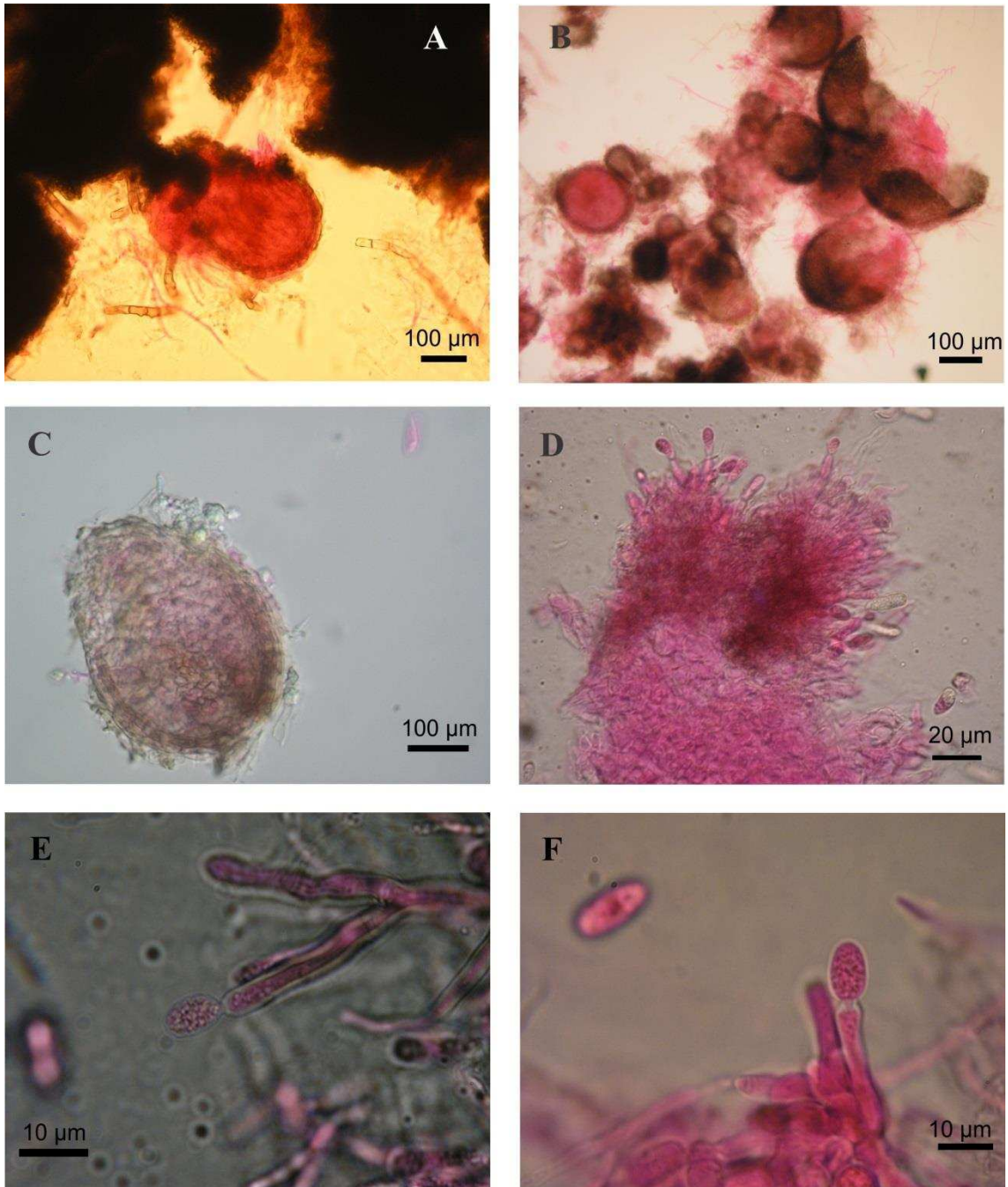
Origen de la cepa: ARGENTINA. Entre Ríos, Reserva Nacional El Palmar. 31° 54' 0" S, 58° 15' 0" O, a partir de hoja asintomática de *Blepharocalyx salicifolius*, Español E.

Notas: Este género fue descrito en pecíolo de *Licuala* sp por Goh y Hyde (1998) en Brunéi. *Polybulbophiale palmicola* no ha sido citada en otros hospedantes, nunca como endofito de hoja y pecíolo. En Argentina no ha sido reportado previamente, por lo que es el primer registro de la especie para el país.

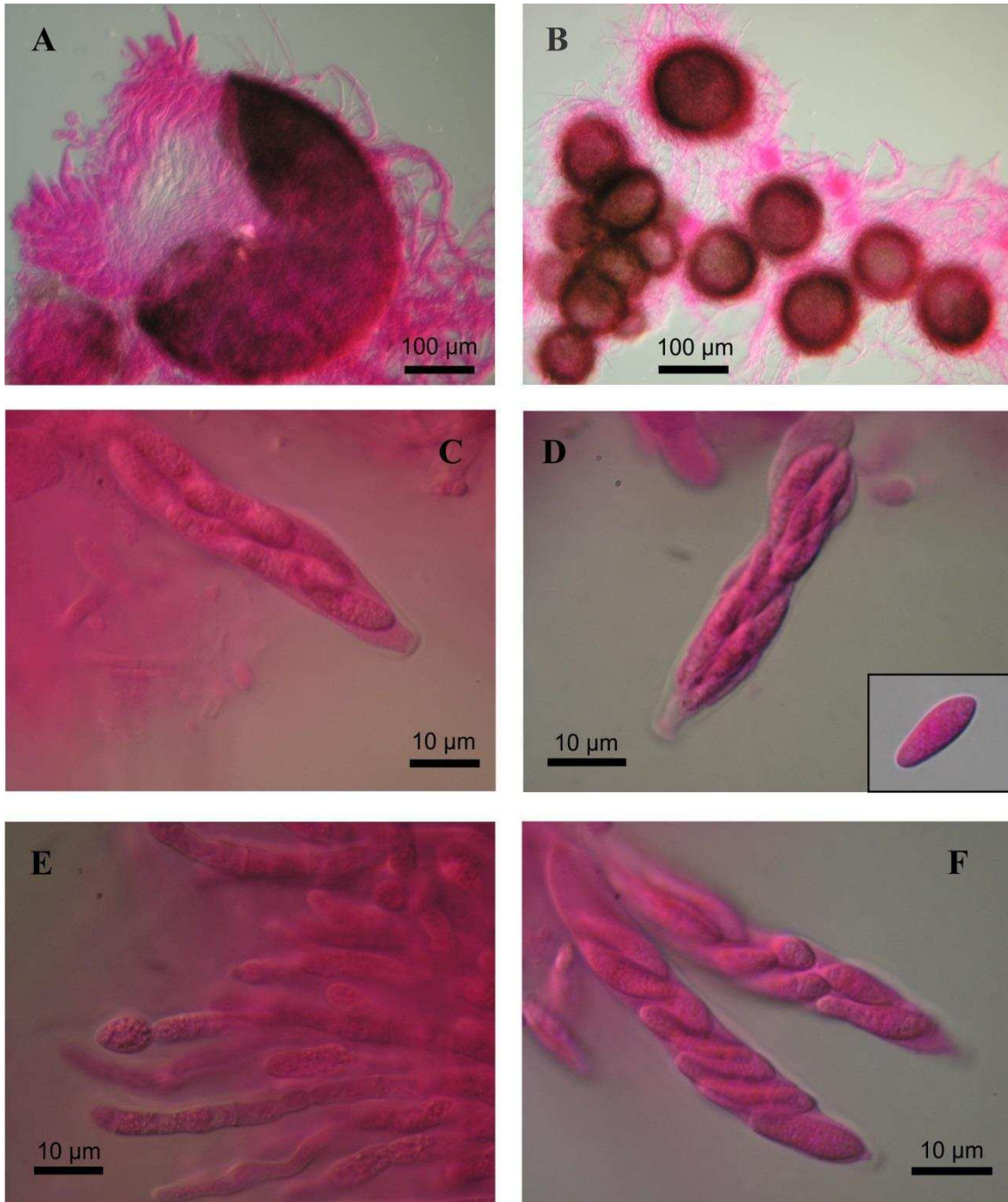


**Fig. 1.25a.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Colletotrichum boninense*. A y C: conidios en suspensión y detalle de contenido interno. B, D y E: relación de tamaños de ascosporas y conidios. F, G y H: Ascosporas y detalle de ascosporas.

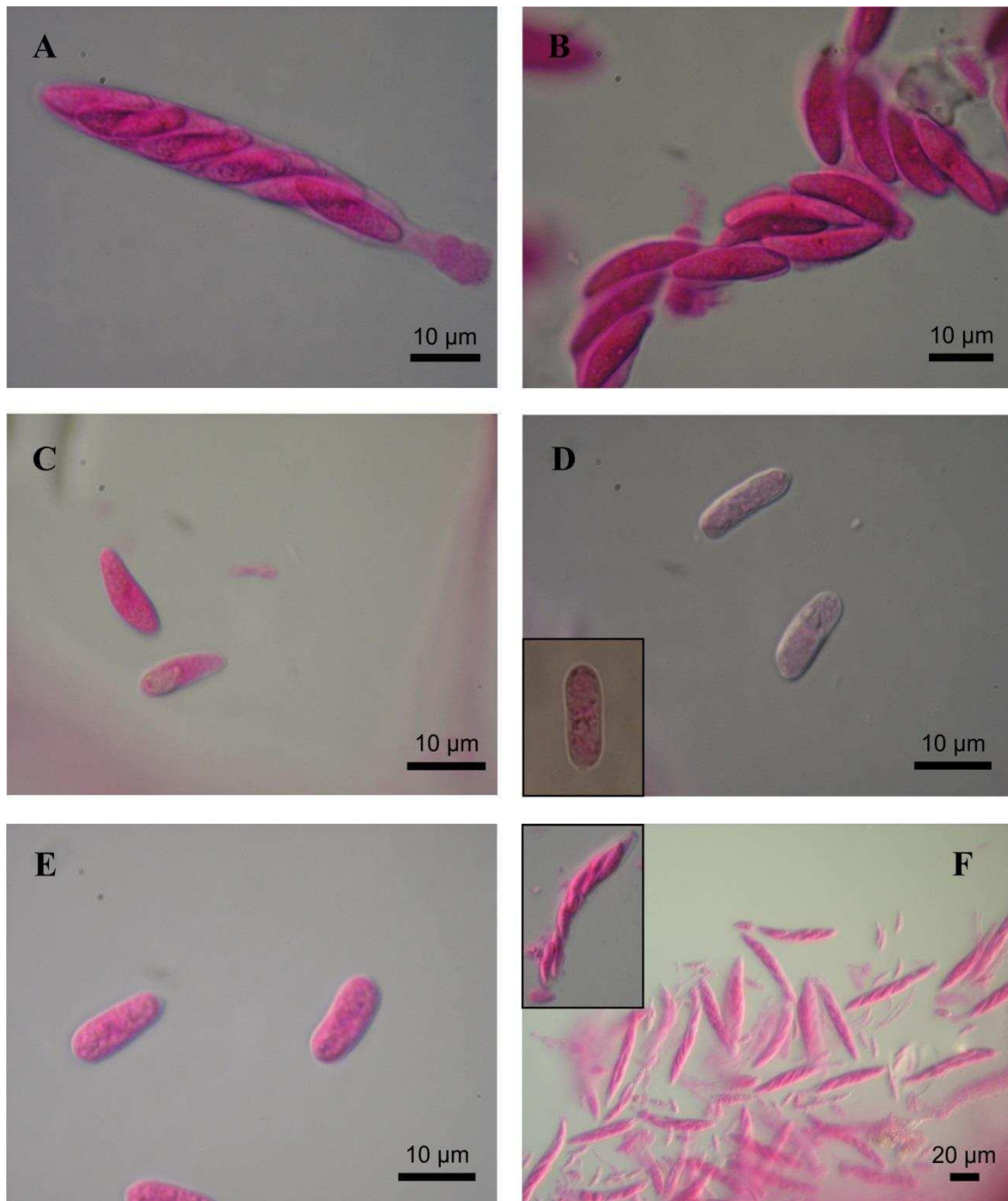




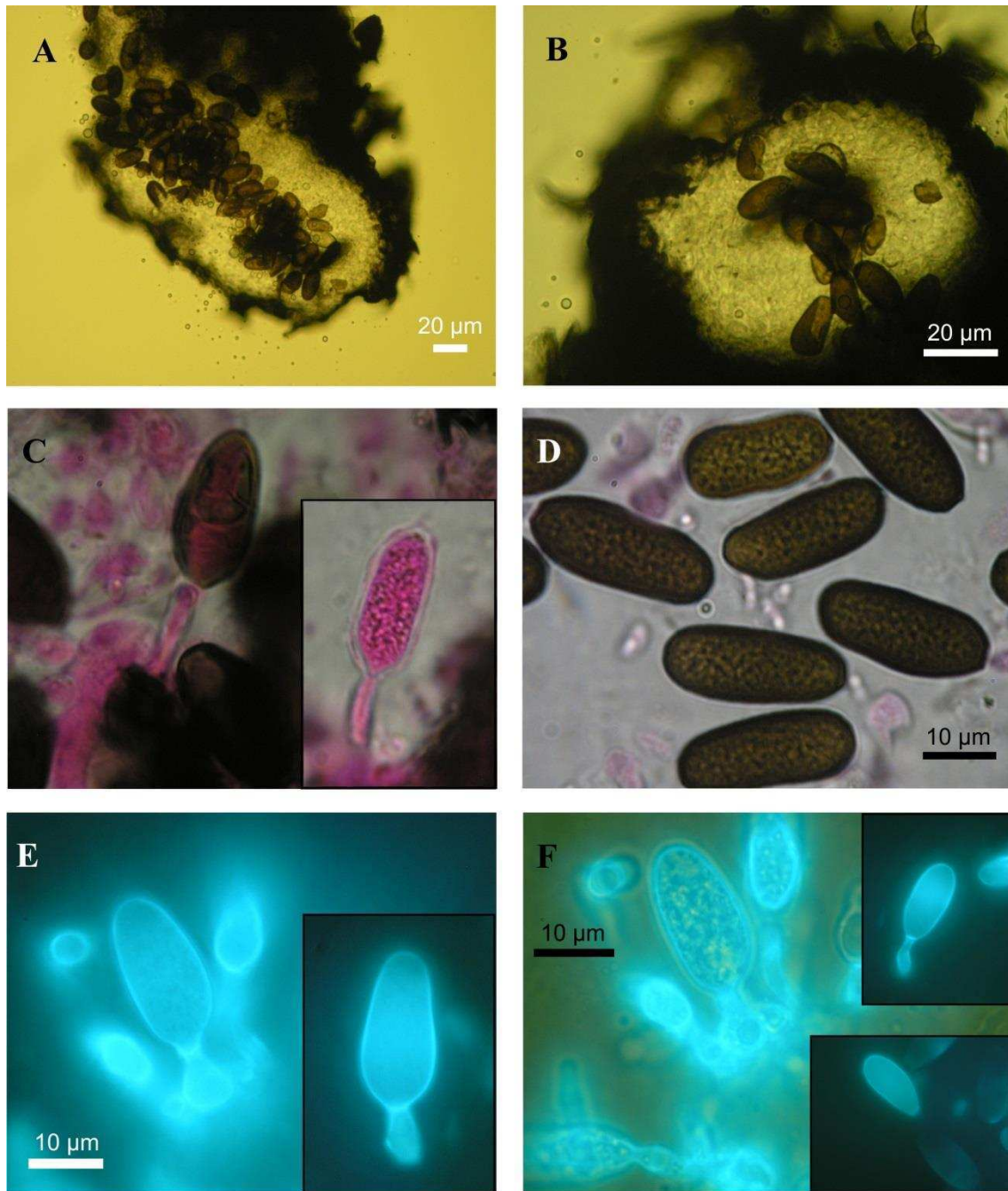
**Fig. 1.25b.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Colletotrichum boninense*. A, B y C: peritecios inmaduros (B y C) y peritecio maduro con ascos (A) emergiendo. D, E y F: Detall de células condiogenas con formación de conidio.



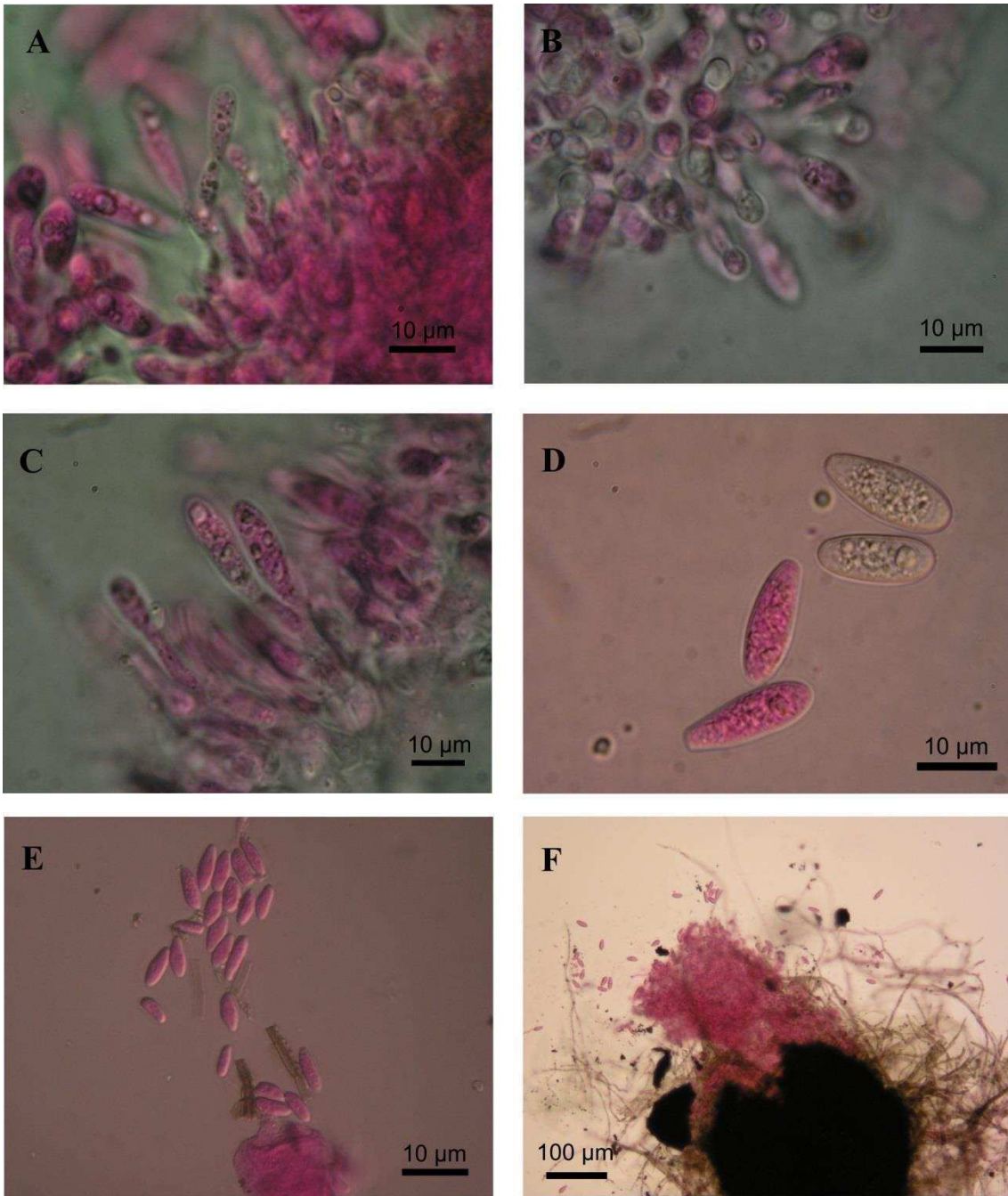
**Fig. 1.26a.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Colletotrichum karstii*. A y B: Peritecio maduros expulsando ascos y peritecios inmaduros. C y D: Detalle de ascos. E: células conidiogénicas y formación de conidio. F: Asco maduro con detalle de ascosporas.



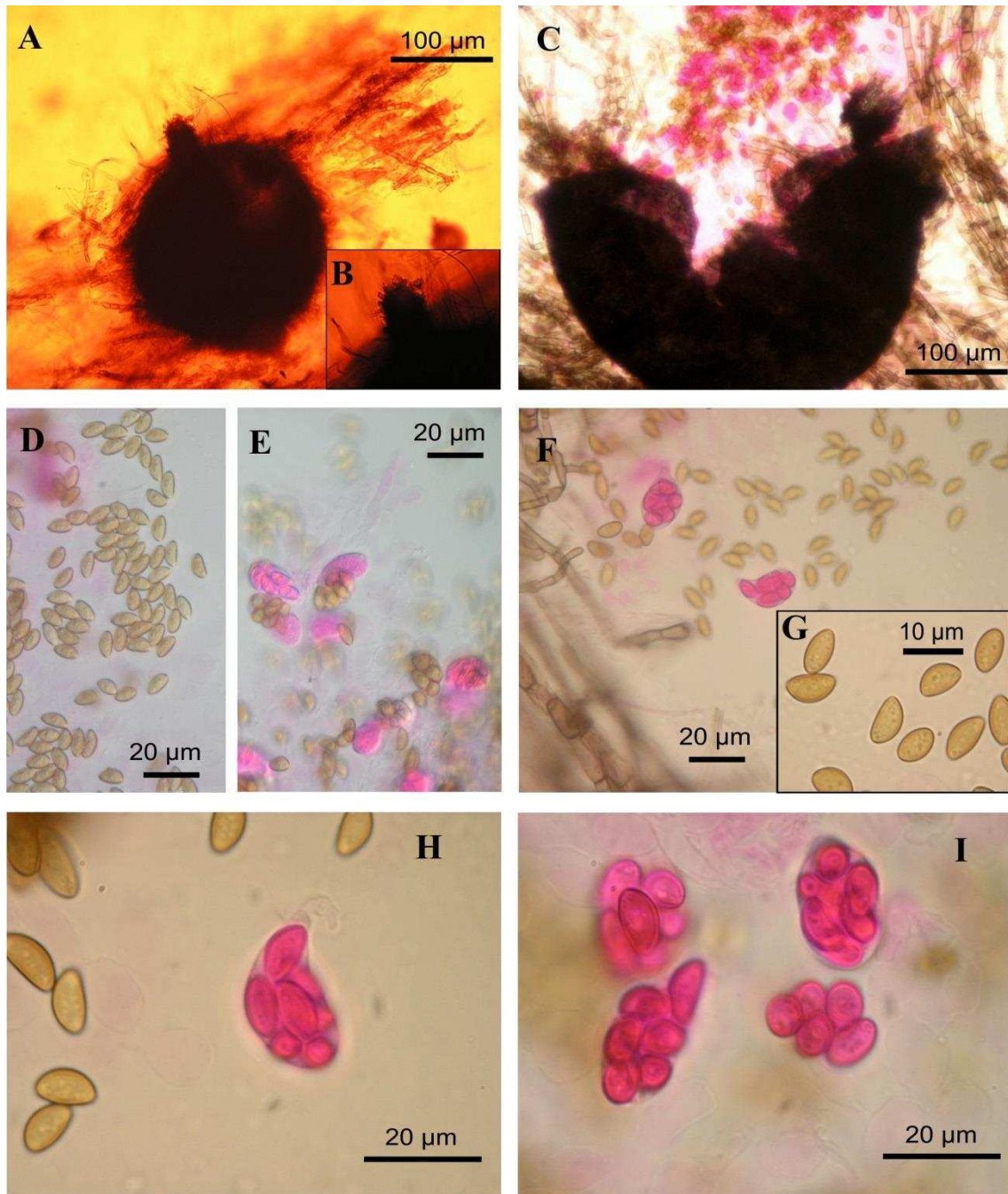
**Fig. 1.26b.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Colletotrichum karstii*. A: Asco con ascosporas (8) donde se observa el pie del asco. B: Detalle de ascosporas dentro del asco colapsado, donde se observa claramente el núcleo de las esporas. C, D y E: ascosporas y conidios en suspensión respectivamente teñidos con floxina. F: grupo de ascos en suspensión teñidos con floxina.



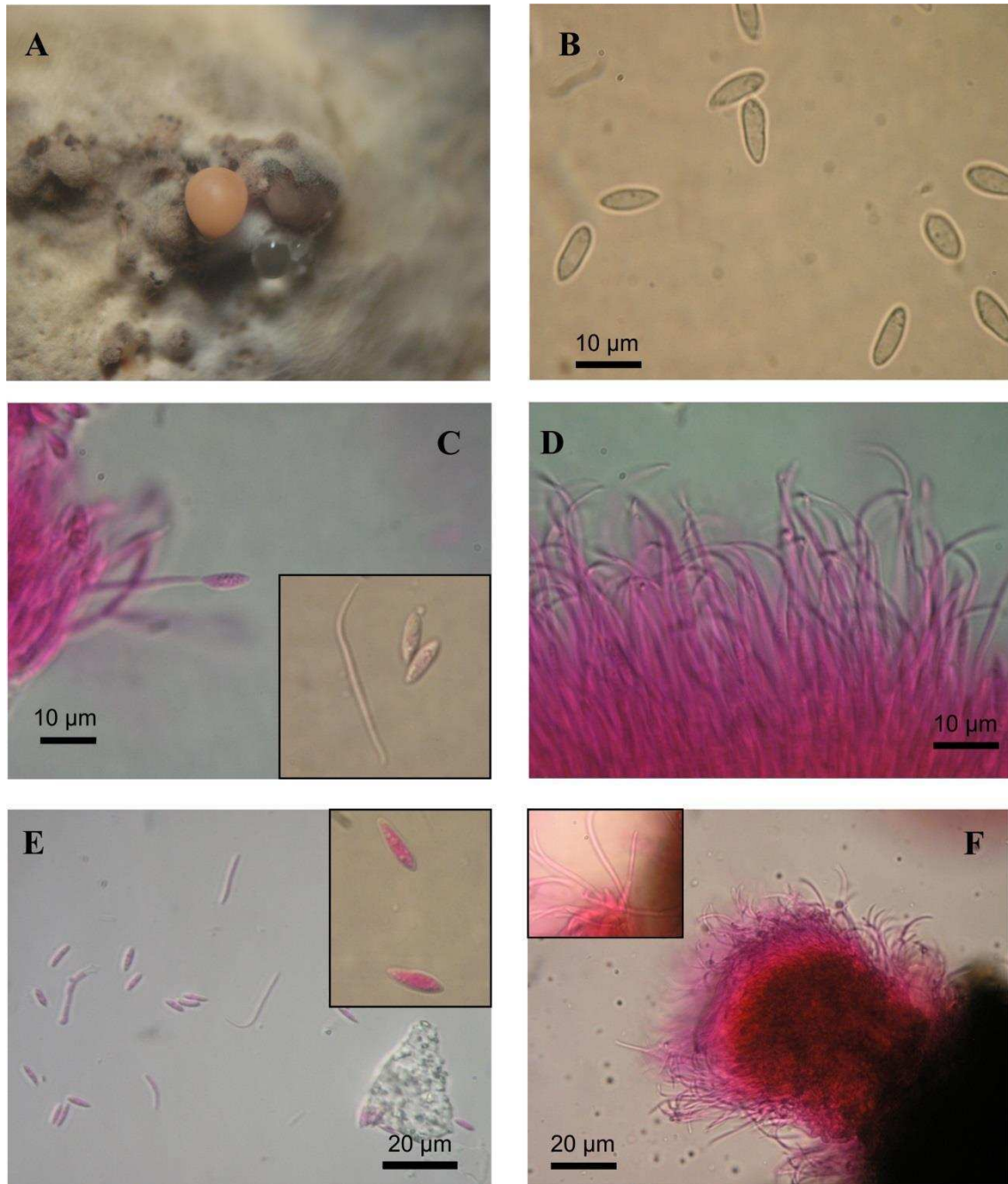
**Fig. 1.27.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Diplodia pseudoseriata*. A y B: se muestran los estromas con esporas en su interior de color castaño. C y D: se muestran la célula conidiogena unida a una espора en maduración y detalle de los conidios de maduros donde se observa ornamentación de la pared interna. E y F: fotografías de fluorescencia, se observa la pared y la parte basal de la espора que fluoresce en mayor medida en la unión entre el conidio y la célula conidiogena.



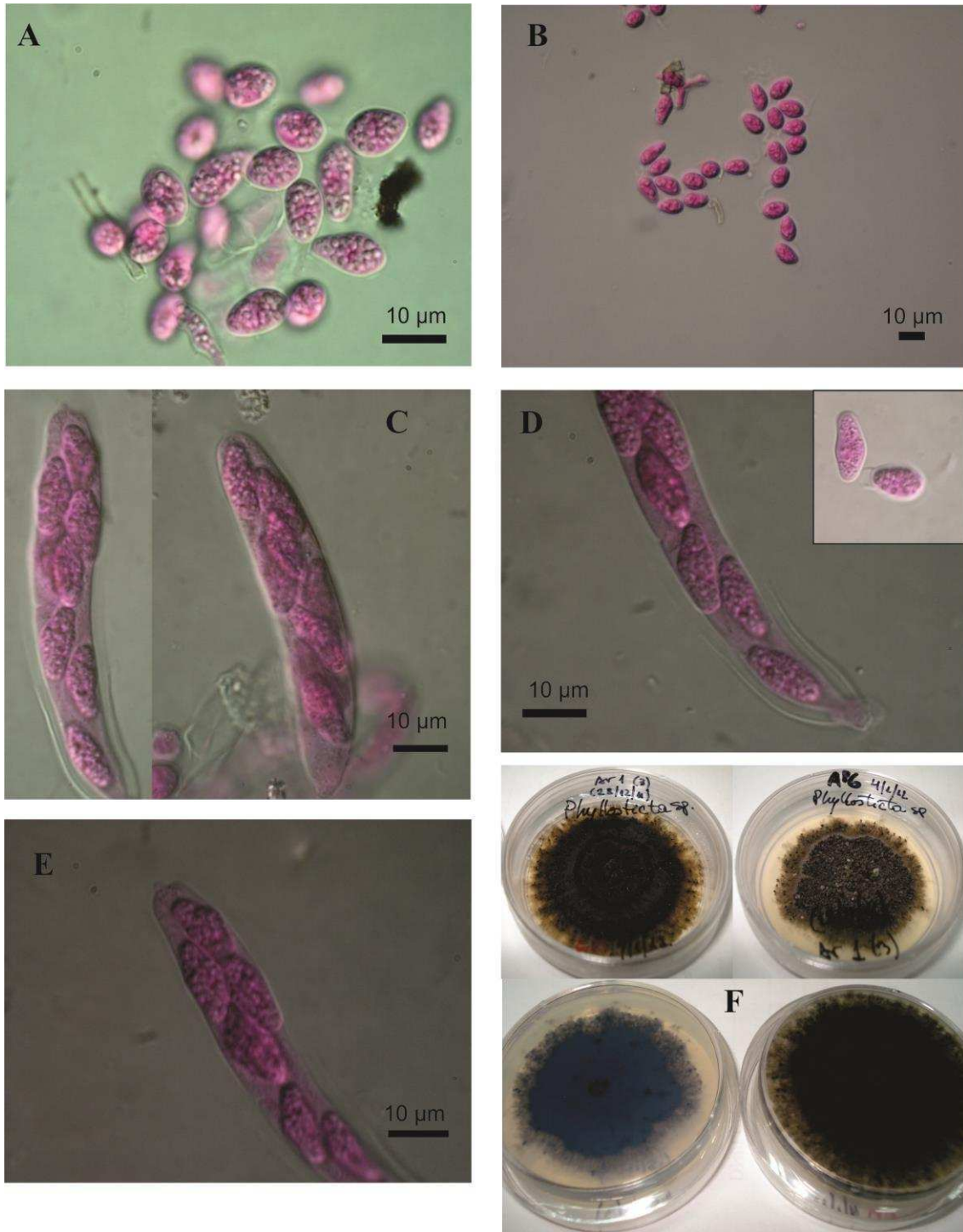
**Fig. 1.28.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Fusicoccum aesculi*. A, B y C: se muestran grupos de células conidiogenas con espóra en maduración. D y E: se observan conidios y detalle de los conidios de maduros donde se observa el contenido intracelular. F: se muestran los estromas con esporas.



**Fig. 1.29.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Petriella sordida*. A y B: se observa el aspecto general de los peritecios y en B: detalle del cuello del peritecio. D, E y F: aspecto general de los ascos y ascosporas. G: detalle de ascosporas, color castaño claro. H: detalle de asco con ascosporas teñidas con floxina en su interior y ascosporas maduras libre en el medio. I: detalle de un grupo de ascos y ascosporas en su interior teñidas con floxina donde se observa en grosor de las pared de la ascospora.

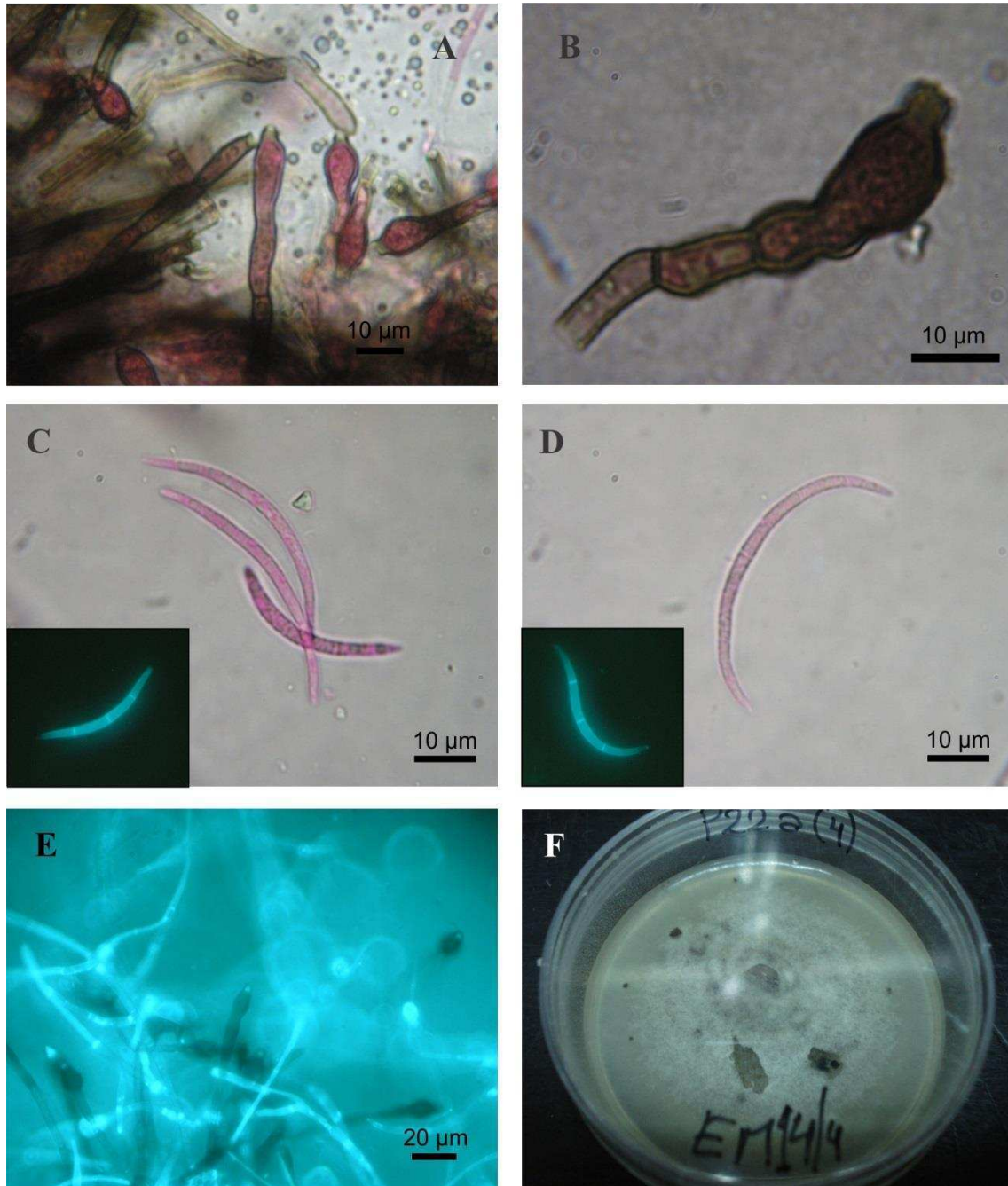


**Fig. 1.30.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Phomopsis archeri*. **A:** aspecto general de las masas de conidios alfa y beta. **B:** alfa conidios. **C:** alfa conidio unido a una célula conidiógena, y relación de tamaño entre los alfa y beta conidios (recuadro). **D:** detalle de conjunto de células conidiógenas con sus respectivos beta conidios. **E:** aspecto general de esporas alfa y beta conidios en suspensión y detalle de alfa conidio teñidas con floxina. **F:** aspecto general de masa de beta conidios y células conidiógena, detalle de la unión entre la célula conidiógena y el beta conidio (recuadro).



**Fig. 1.31.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Phyllostica spinarum*. A y B: Conidios en suspensión teñidos con floxina, se observa la capa de mucilago que rodea al conidio y apéndice posterior. C, D y E: Ascus con ascosporas (8), Ascospora y conidio en suspensión, relación de tamaño (recuadro en D). F: Aspecto del Cultivo en Extracto de Malta (frente y reverso).





**Fig. 1.32.** Fotografías de microscopio óptico de la especie *Polybulbophiale palmicola*. A y B: detalle de células conidiogamas melanizadas. C y D: Conidios filiformes y detalle de conidios con sus septos en fluorescencia. E: micelio y células conidiogamas en Fluorescencia. F: Aspecto general de la colonia (frente).

## Discusión

Durante este estudio se ha caracterizado por primera vez la comunidad de endofitos fúngicos foliares de *Blepharocalyx salicifolius* en poblaciones Argentinas. En este trabajo se registraron 18 especies en los 3 sitios muestreados, de las cuales 13 fueron registradas sólo en la Reserva Natural Punta Lara, 8 especies sólo en la Reserva Ecológica Costanera Norte y 5 especies sólo en San Antonio de Areco. Las curvas de acumulación de especies obtenidas (Fig. 1.6–1.15) junto con los índices de riqueza señalaron que un número mayor de especies al encontrado estaría presente, indicando que serían necesarios muestreos adicionales para poder alcanzar el plateau de la curva y tener conocimiento real de la diversidad completa de la comunidad endofítica, principalmente en la Reserva Ecológica Costanera Norte y en San Antonio de Areco donde las curvas evidenciaron diferencias sustanciales (Fig. 1.9).

Por otro lado el índice de Sorensen parece indicar que las comunidades de la Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte presentan alta semejanza entre ellas, posiblemente debido a las similitudes respecto de las comunidades vegetales presentes en los sitios. La Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte presentan comunidades vegetales semejantes debido a que muchas de las plantas y semillas viajan río abajo por el Río de la Plata (Cabrera 1971; Barneche et al. 2010). Por otro lado la población estudiada en San Antonio de Areco se encuentra a 42 km, fuera de la influencia del corredor del Río de la Plata, (sitio 3) mostrando un índice de diversidad similar al de la Reserva Ecológica Costanera Norte, aunque menor, pero con

diferentes valores de riqueza, sin embargo esto podría ser explicado por la equitatividad observada en las comunidades.

Los análisis estadísticos realizados para los índices de diversidad de Simpson y Shannon indican que hay diferencias significativas entre los 3 sitios estudiados. Ambos índices de diversidad revelan el mismo resultado general, que todos los sitios son distintos entre sí. El análisis del índice de Simpson muestra valores de significancia más bajos que los obtenidos por Shannon, lo que indicaría que este índice es más sensible al número de especies. El índice de Shannon por su parte contempla tanto la riqueza de especies como su abundancia lo cual podría explicar esas diferencias. Estos valores de significancia menores observados en el índice de Shannon junto con los resultados del análisis de Equitatividad, que señalaron que no hay diferencias entre la Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte, mostrando que hay diferencias con San Antonio de Areco en esta componente, y sumado a lo obtenido con el índice de similitud de Sorensen sugerirían que a pesar de las diferencias encontradas entre estos 2 sitios, presentarían más semejanza entre sí, que con respecto a San Antonio de Areco la cual es una zona agroeconómica importante y de gran disturbio antrópico.

Datos previo de la comunidad endofítica de *Blepharocalyx salicifolius* en una población de Uruguay, fueron brindados por Bettucci et al. (2004) y parcialmente por (Pérez et al. (2008); 2010) quien enfoco su trabajo principalmente en la familia Botryosphaeriaceae. Bettucci et al. (2004) informaron una riqueza endofítica foliar media de ocho especies y obtuvo aislamientos solo de la mitad de los fragmentos analizados en hojas, estos datos representan un porcentaje de aislamientos mayor que el obtenido durante este trabajo. Estos autores llevaron a cabo su trabajo en “Quebrada de los Cuervos” (Uruguay) (Fig. 1). “Quebrada de los Cuervos” tiene una superficie de 365 hectáreas, que ha sido

protegida desde 1986, sin ningún proceso crítico de transformación, y constituye un pasaje estrecho del arroyo “Yerbal chico” localizado en “Sierra del Yerbal”, Uruguay.

Los principales ecosistemas son bosque de quebrada, praderas, cañada, arroyo y ríos. El mantenimiento de este ecosistema se debe en parte a la inaccesibilidad de la zona. Esta zona caracterizada por pequeños bosques, identificándose pequeños bosquecillos integrados por especies arbóreas y arborescentes de aspecto achaparrado, así como especies de cactáceas (Basso y Pouso 1992), mientras que las comunidades evaluadas en este estudio, corresponden a bosque marginal higrofilo. Nuestros resultados mostraron solamente 2 especies aisladas en común, con lo reportado por Bettucci et al. (2004): *Colletotrichum* sp y *Pestalotiopsis guepinii*. El taxón mas abundante por Bettucci et al (2004) fue *Discosporium eugeniae*, el cual no fue encontrado durante este estudio.

Considerando los resultados obtenidos aquí y los resultados en otros estudios, se sugiere que la composición de la comunidad de endófitos fúngicos parecería estar más influenciada por condiciones externas, las cuales determinarían posiblemente la disponibilidad del inoculo, en vez de por la especificidad del hospedante. La Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte están localizadas en los márgenes del Río de la Plata (Fig. 1.1), mientras que el sitio 3 está localizado en un área rural a 120 km de La Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte. A pesar que los sitios muestran diferencias en el grado de disturbio antrópico y el origen del paisaje, sus condiciones climáticas son muy similares (ver materiales y métodos).

Un tema interesante para discutir es el análisis derivado de los morfotipos más abundantes encontrados en las áreas protegidas. Los datos mostraron que *Glomerella cingulata*, junto a especies identificadas como *Colletotrichum* (estado anamorfo), son

los taxones más frecuentes en La Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte; pero no en San Antonio de Areco, donde *Glomerella cingulata* no fue registrada. En cuanto a las especies de *Colletotrichum* Corda encontradas, dado que se registraron tanto especies de *C. boninense* como *Colletotrichum* sp en los sitios muestreados y debido a las grandes incertezas taxonómicas que presenta *Colletotrichum* Corda como grupo en cuanto a su clasificación, y la plasticidad de este organismo en cuanto a sus características morfológicas sobre distintos hospedantes, no habría que descartar que miembros de *C. boninense* también podrían ser encontrados en la Reserva Ecológica Costanera Norte (Fig. 1.1).

Por otro lado la especie más abundante en San Antonio de Areco correspondió a *Phyllosticta spinarum*, la cual no fue registrada en La Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte. Estas diferencias en las especies más frecuentes indican un cambio drástico en el ensamble de la comunidad y algún factor de cambio o reemplazo. En este sentido, Suryanarayanan et al. (2011) han mostrado que el ensamble endofítico de árboles creciendo en tres tipos de bosques tropical, pueden estar conformadas por distintas especies dominantes. Nuestros resultados corroboran sus observaciones en concordancia con la hipótesis de baja especificidad. En este caso, tomando en cuenta las características de los sitios muestreados, podemos explicar las diferencias observadas considerando las distancias entre los sitios estudiados, e hipotetizar que los corredores biológicos asociados a los ríos Uruguay y Paraná podrían tener alguna influencia en la dispersión de las especies fúngicas a lo largo de ellos.

A su vez recientemente algunos estudios han intentado explicar el origen de las diferencias observadas entre comunidades de endófitos, pero sólo unos pocos factores han sido identificados. En este sentido Bahnweg et al. (2005) trabajando en hojas de haya, señalan que la exposición a la luz y que el régimen de ozono afectan las hojas del

hospedante, por otro lado Botella et al. (2010) señalan evidencian que el “tipo de suelo”, la edad del árbol y en algunos casos, la temperatura media podrían explicar las diferencias. Sin embargo, los factores mencionados por Bahnweg et al. (2005) y Botella et al. (2010) muestran pequeñas variaciones entre los sitios estudiados aquí.

Hasta aquí, estos resultados subrayan la necesidad de estudios para empezar a entender las causas que promueven las diferencias en las riquezas observadas en los sitios considerados. Un mayor número de investigaciones sobre endófitos fúngicos son necesarias para establecer si el disturbio antrópico del hábitat o transformación es un factor no considerado hasta el momento, que podría modular el ensamble de las comunidades fúngicas endofítica y/o determinar el grado de influencia que tiene sobre las comunidades.

## *Capítulo 2*

---

**Efecto del ambiente sobre la  
Diversidad de endofitos en  
poblaciones de *Blepharocalyx*  
*salicifolius***

## Capítulo 2

### Efecto del ambiente sobre la Diversidad de endofitos en poblaciones de

#### *Blepharocalyx salicifolius*

### Introducción

Dado el impacto que tiene el establecimiento de la interacción entre las plantas y los endofitos en los distintos ecosistemas naturales (van der Heijden et al. 1998; Clay y Holah 1999; Hartnett y Wilson 1999; Liu et al. 2011; Rocha et al. 2011; Suryanarayanan et al. 2011; Aschehoug et al. 2012; Iannone et al. 2012) diferentes trabajos se han focalizado en el estudio de las variaciones en la composición de la comunidad fúngica endofítica, y hasta el momento las conclusiones son variadas (Arnold 2007b; Arnold y Lutzoni 2007a; Helander et al. 2007; U'Ren et al. 2012; Lau et al. 2013). Arnold (2007b). Suryanarayanan et al. (2011) sugieren que el ambiente tiene un rol más importante en la conformación de los ensambles de endofitos de un hospedante que la identidad del hospedante. U'Ren et al. (2012) evaluaron asociaciones fúngicas de endofitos y endolíquenes con sus hospedantes a escala continental y registraron que, en diferentes regiones, el mismo hospedante es infectado por distintos simbiontes locales. Por otro lado, de Errasti et al. (2010) trabajando en tres hospedantes en una sola locación, y Arnold y Herre (2003a) trabajando en plantas tropicales, proveen evidencia que podría indicar que los endofitos tendrían una especificidad que depende del tejido y del hospedante. Sun et al. (2012) obtuvieron similares resultados, sugiriendo que los tipos de tejidos y los hospedantes afectan la estructura de la comunidad endofítica en un bosque templado mixto.



Entender cómo cambia la composición de las especies de una comunidad endofítica podría permitirnos dilucidar cuáles son los procesos involucrados en estos cambios y cuáles son los roles funcionales de cada endofito en la interacción. Estudios previos destacan dos escalas principales (local o regional), con diferentes respuestas a los factores que modulan la comunidad endofítica.

Considerando la disparidad en cuanto a riqueza obtenida para cada uno de los sitios estudiados en el Capítulo 1, en el cual se observó distintos valores de riqueza así como diferencias en los índices de diversidad para el hospedante *B. salicifolius*, se cuestiona hasta qué punto o qué grado de influencia puede tener el hospedante en la composición de la comunidad endofítica. Los resultados del capítulo anterior, se alinean con lo observado por Suryanarayanan et al. (2011), sugiriendo que las condiciones del ambiente podrían tener un peso mayor sobre la dispersión de los endofitos, que el hospedante. Por lo tanto la variabilidad encontrada en las comunidades endofíticas estudiadas parecería descartar una alta especificidad en cuanto al hospedante, sugiriendo entonces que factores que externos podrían explicar mejor las variaciones encontradas.

Actualmente las variables ambientales están siendo objeto gran estudio ya que la mera variación inter e intra hospedante no explica las variaciones encontradas, por lo tanto el siguiente paso es evaluar distintos factores ambientales que podrían tener un grado mayor de influencia sobre los ensambles (Helander et al. 2007).

Uno de los principales factores aceptados como responsable de la modificación de las comunidades es el disturbio antrópico (Lindborg y Eriksson 2004; Tylianakis et al. 2007). En varios trabajos se ha propuesto que la actividad humana resulta en la pérdida o la adición de especies con ciertos rasgos funcionales y por lo tanto modifica la funcionalidad del ecosistema (Kremen 2005; Barragán et al. 2011). Los pocos artículos llevados a cabo en comunidades fúngicas indican que algunos grupos funcionales de

hongos podrían ser afectados por este tipo de disturbio o transformación (Byrd et al. 2000; Barbaruah et al. 2012).

Actualmente el foco está puesto en el mantenimiento de la diversidad genética a escala global, y ha llevado a la búsqueda de herramientas y criterios para la conservación de paisajes naturales que puedan albergar y contener la mayor cantidad de biodiversidad. Sin embargo, los recursos, humanos y/o económicos, y la infraestructura necesaria para tal fin, hacen muchas veces impracticable estos objetivos. Por lo tanto, pequeñas áreas naturales protegidas, que contrastan con las áreas aledañas modificadas por el hombre, representan un esfuerzo a escala local ofreciendo un marco interesante para evaluar el impacto de la transformación antrópica.

Considerando la variabilidad de los endofitos fúngicos foliares observada en diferentes poblaciones de *B. salicifolius*, y por lo tanto contraponiéndose a la especificidad del hospedante, en este capítulo se estudió el potencial impacto de variables ambientales y el disturbio del hábitat, o transformación, en la comunidad fúngica de endofitos.

Para esto, cada uno de los sitios estudiados en el Capítulo 1, fue caracterizado por varios parámetros ambientales y se realizó una estimación del grado de disturbio antrópico de cada uno de los mismos.

## **Objetivo**

Evaluar posibles factores ambientales que puedan influir en la composición de las comunidades endofíticas en *Blepharocalyx salicifolius*.

## **Materiales y Métodos**

### ***Área de Estudio***

Caracterización de las poblaciones muestreadas

En las mismas áreas que se muestrearon en el Capítulo 1 (sitios 1, 2 y 3) se registraron las coordenadas geográficas, usando un GPS (Global Positioning System). Las coordenadas geográficas fueron convertidas a unidades decimales para su posterior análisis, de manera de poder ser ingresadas en una matriz.

### ***Caracterización climática***

Para los 3 sitios, siete variables geográficas y climáticas fueron consideradas con el fin de analizar las variables ambientales dentro del área de estudio previo.

Estas siete variables climáticas fueron registradas de una compilación de (De Fina 1992), las cuales consisten de un periodo de 10-30 años de información climática acumulada, obtenida de estaciones meteorológicas cercanas a las localidades muestreadas.

Las variables consideradas fueron: (1) temperatura media del mes más cálido (°C); (2) temperatura media anual (°C); (3) temperatura media del mes más frío; (4) precipitaciones medias anuales (mm); (5) precipitaciones medias del trimestre más

cálido; (6) precipitaciones medias del trimestre más frío; (7) Altura al nivel del mar (Tabla 2.1).

***Datos ambientales adicionales.***

De manera adicional, se obtuvieron datos de Humedad Relativa, Temperatura y Heliofania (representa la duración del brillo solar u horas de sol directa) para los sitios 1, 2 y 3. Estos datos fueron obtenidos de estaciones del Servicio Meteorológico Nacional, INTA y de la estación meteorológica Arecoclima a partir de las estaciones más próximas posibles a cada sitio evaluado.

**Tabla 2.1. Resumen de las distintas fuente de datos ambientales.**

Sitios	Estación	Fuentes
Reserva Natural Punta Lara (sitio 1)	Aeroparque	INTA, SMN, De Fina (1992)
Reserva Ecológica Costanera Norte (sitio 2)	La Plata	INTA, SMN, De Fina (1992)
San Antonio de Areco (sitio 3)	San Antonio de Areco	Areco clima, INTA, De Fina (1992)

**Sitios evaluados en el Capítulo 1. SMN: Servicio Meteorológico Nacional, INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.**

***Transformación antrópica***

Por otro lado, para cada sitio se calculó un índice de disturbio antrópico, denominado “transformación”, el cual fue agregado al análisis de PCA junto con las variables ambientales. Este parámetro fue estimado como la inversa de la distancia media entre cada sitio muestreado y el punto más cercano, en promedio, a un punto de modificación del terreno, entendiéndose como cualquier estructura de urbanización moderna. El promedio de esas distancias se calculó a partir de 10 mediciones hechas en direcciones al azar.

### *Análisis Estadísticos*

Con el fin de evaluar la distribución espacial de los sitios basada en la diversidad de endofitos identificados en el Capítulo 1, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), a partir de una matriz de frecuencias de cada especie para cada sitio.

Por otro lado, considerando los resultados obtenidos de riqueza y las diferencias en los índices de diversidad obtenidos en el capítulo 1 se realizó un PCA para caracterizar los sitios de muestreo de acuerdo con variables geográficas y climáticas (1-6), latitud, longitud, altitud y “transformación”. Los datos climáticos y espaciales se estandarizaron siguiendo, Novas et al. (2007).

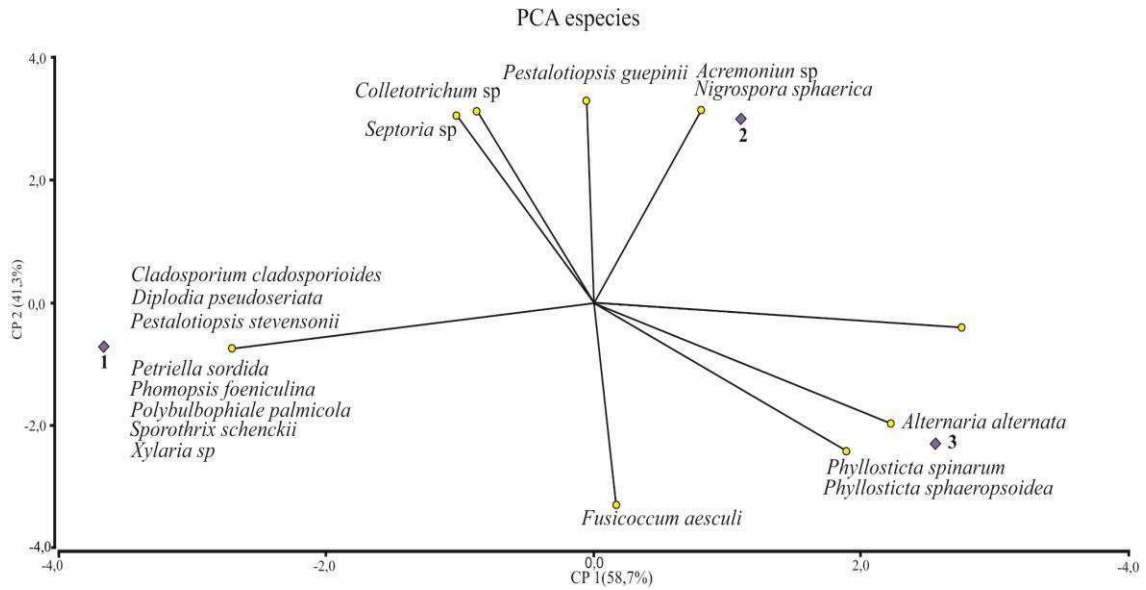
Para evaluar el grado de diferencia entre las variables Temperatura, Humedad relativa y “Transformación” se realizó un Anova de 1 factor para evaluar si las diferencias observadas eran significativas. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico InfoStat.

## Resultados

### *Caracterización de los sitios a partir de la diversidad endofítica*

El análisis PCA realizado con las especies de hongos endofíticos aislados se representa en la Fig. 2.1, donde no se observa una agrupación clara entre sitios y se evidencia que los sitios se separan claramente unos de otros en los distintos ejes. Mientras el eje 1 separa la comunidad del sitio 1 de los otros dos sitios, las comunidades de los sitios 2 y 3 pueden ser separadas por el eje 2.

Los taxones principales asociados al sitio 1, en un orden decreciente de frecuencia, fueron *Colletotrichum* sp, *Xylaria* sp., *Fusicoccum aesculi*, y *Cladosporium cladosporioides*. Los taxones asociados principalmente al sitio 2 fueron *Acremonium* sp, *Nigrospora sphaerica* y *Phomopsis archeri*. Para el sitio 3 fueron *Phylosticta spinarum* y *Phylosticta sphaeropsoides*.



**Fig. 2.1. Gráfico de PCA para las especies endofíticas. Los número se indican los sitios, 1: Reserva Natural Punta Lara, 2: Reserva Ecológica Costanera Norte, 3: San Antonio de Areco.**

**Tabla 2.2. Valores de Autovectores para el PCA a partir de la frecuencia de especies endofíticas.**

Autovectores		
Variables	e1	e2
<i>Acremonium sp</i>	0,09	<b>0,35</b>
<i>Alternaria alternata</i>	0,25	-0,22
<i>Cladosporium cladosporioid..</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Colletotrichum spp</i>	-0,1	<b>0,35</b>
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Fusicoccum aesculi</i>	0,02	<b>-0,37</b>
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0,09	<b>0,35</b>
<i>Petriella sordida</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	-0,01	<b>0,37</b>
<i>Pestalotiopsis stevensonii..</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Phomopsis archeri</i>	<b>0,31</b>	-0,04
<i>Phomopsis foeniculina</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Phyllosticta sphaeropsoide..</i>	0,21	-0,27
<i>Phyllosticta spinarum</i>	0,21	-0,27
<i>Polybulbophiale palmicola</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Septoria sp</i>	-0,11	<b>0,34</b>
<i>Sporothrix schenckii</i>	<b>-0,3</b>	-0,08
<i>Xylaria sp</i>	<b>-0,3</b>	-0,08

Se resaltan los valores mas significativos.

### *Análisis de variables ambientales*

Como resultado del PCA basado en variables geográficas, climáticas y de “transformación” antrópica, se ilustra en la Figura 2.2 la distribución espacial de los sitios.

En el gráfico se observa que en el eje 1 se separan dos grupos: uno conformado por los sitios 1 y 3; y otro grupo conformado por el sitio 2. El eje 1 se asoció positivamente con los trimestres de precipitaciones más frío y más cálidos, con la latitud, la longitud y la temperatura media del trimestre más cálido, mientras que el sitio 2 se ubicó en el extremo opuesto asociándose a valores negativos de temperatura media y de “transformación”.

El eje 2 no logra separar claramente los sitios entre si y está asociado con valores positivos de precipitaciones anuales y temperatura del mes más frío. El sitio 3 quedó asociado a los valores positivos de altura de y de precipitación del trimestre más frío, alejado del 1: el sitio 2 no se asocia a ninguna de las variables.



**Tabla 2.3. Variables ambientales evaluadas, de Fina (1992).**

Variables	sitios		
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
(1)	22,6	22,9	23,1
(2)	12,46	13,37	16,25
(3)	9,8	10,3	9,4
(4)	935	946	913
(5)	224	242	255
(6)	194	182	138
(7)	4	5	37
latitud	34°49'00"S	34°32'20"S	34°15'43"S
longitud	57°58'00"	58°26'36"O	59°28'0"O
“Transformación” (m)	4742,86	231,67	352,65

Variables consideradas (1-6) obtenidas de la compilación de, de Fina (1992), geográficas e índice de “transformación”. (1) Temperatura media del mes más cálido (°C); (2) temperatura media anual (°C); (3) temperatura media del mes más frío; (4) precipitaciones medias anuales (mm); (5) precipitaciones medias del trimestre más cálido; (6) precipitaciones medias del trimestre más frío; (7) Altura al nivel del mar (m).

**Tabla 2.4. Datos ambientales adicionales (SMN, INTA, Areco Clima).**

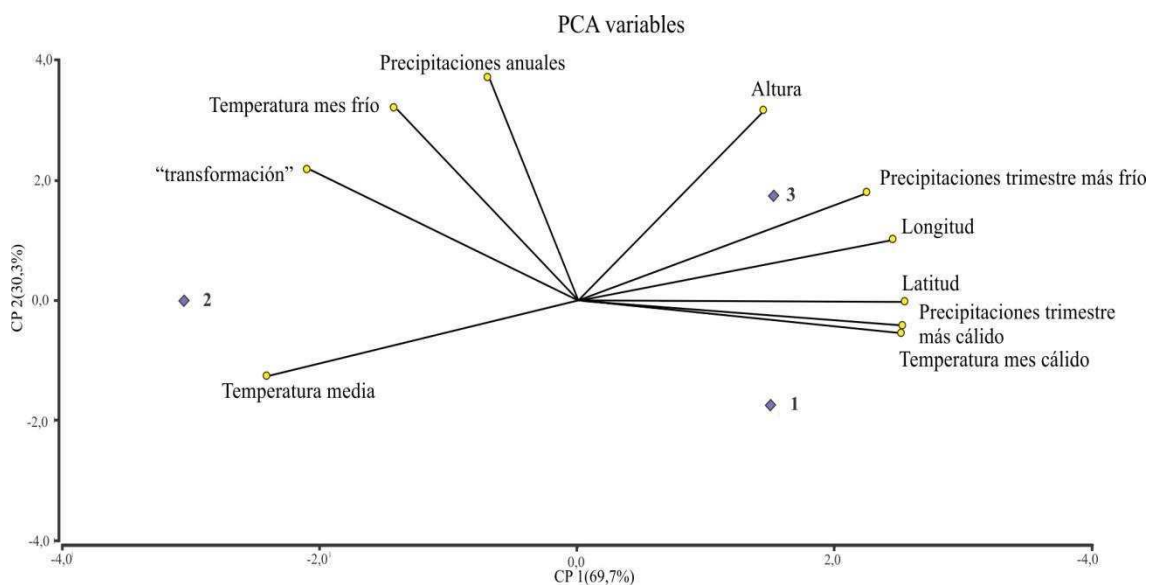
Datos ambientales				
	variables	Temperatura	Humedad relativa	Heliofania
Sitio 1	Media anual	18,13	68,71	7,45
	desvío	5,56	8,14	2
Sitio 2	Media anual	18,32	71,48	7,25
	desvío	4,94	5,78	1,64
Sitio 3	Media anual	17,53	73,22	-
	desvío	5,50	12,31	-

Valores anuales de temperatura en °C, humedad relativa (%) y heliofania promedio (horas de luz directa). Sitio 1: Reserva Natural Punta Lara. Sitio 2: Reserva Ecológica Costanera Norte. Sitio 3: San Antonio de Areco.

**Tabla 2.5. Datos de los Autovalores obtenidos del PCA a partir de las variables ambientales.**

Autovectores		
Variables	e1	e2
(7)	0,22	<b>0,47</b>
(5)	<b>0,38</b>	-0,06
(6)	<b>0,34</b>	0,27
(4)	-0,1	<b>0,55</b>
(1)	<b>0,38</b>	-0,08
(2)	-0,36	-0,19
(3)	-0,21	<b>0,48</b>
Latitud	<b>0,38</b>	-2,90E-03
Longitud	<b>0,37</b>	0,15
“Transformación”	-0,31	0,33

En negrita se indican las variables que se asociaron con mayor peso para cada componente (1) Temperatura media del mes más cálido (°C); (2) temperatura media anual (°C); (3) temperatura media del mes más frío; (4) precipitaciones medias anuales (mm); (5) precipitaciones medias del trimestre más cálido; (6) precipitaciones medias del trimestre más frío; (7) Altura al nivel del mar.



**Fig. 2.2. Gráfico de PCA para las variables ambientales en relación a los sitios. Los números se indican los sitios, 1: Reserva Natural Punta Lara, 2: Reserva Ecológica Costanera Norte, 3: San Antonio de Areco.**

### *Evaluación de las diferencias de humedad relativa entre los sitios*

El análisis de los datos de Humedad Relativa a través de un análisis ANOVA de 1 factor, señala que las diferencias observadas entre los sitios no son significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2.6.1-.2 y Fig. 2.3) a pesar de que el sitio 1 tiene valores menores con respecto a los demás.

**Tabla 2.6.1. Análisis de la varianza de un factor para Humedad relativa (H.R.).**

Sitios	Media de H.R.	Error estándar	H.R. -95%	H.R. +95%	N
1	68,71188	2,167516	64,30203	73,12172	12
2	71,48451	2,167516	67,07466	75,89435	12
3	73,20328	2,167516	68,79344	77,61313	12

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	182157,7	1	182157,7	3231,033	0,000000
Sitios	123,3	2	61,6	1,093	0,346991
Error	1860,5	33	56,4		

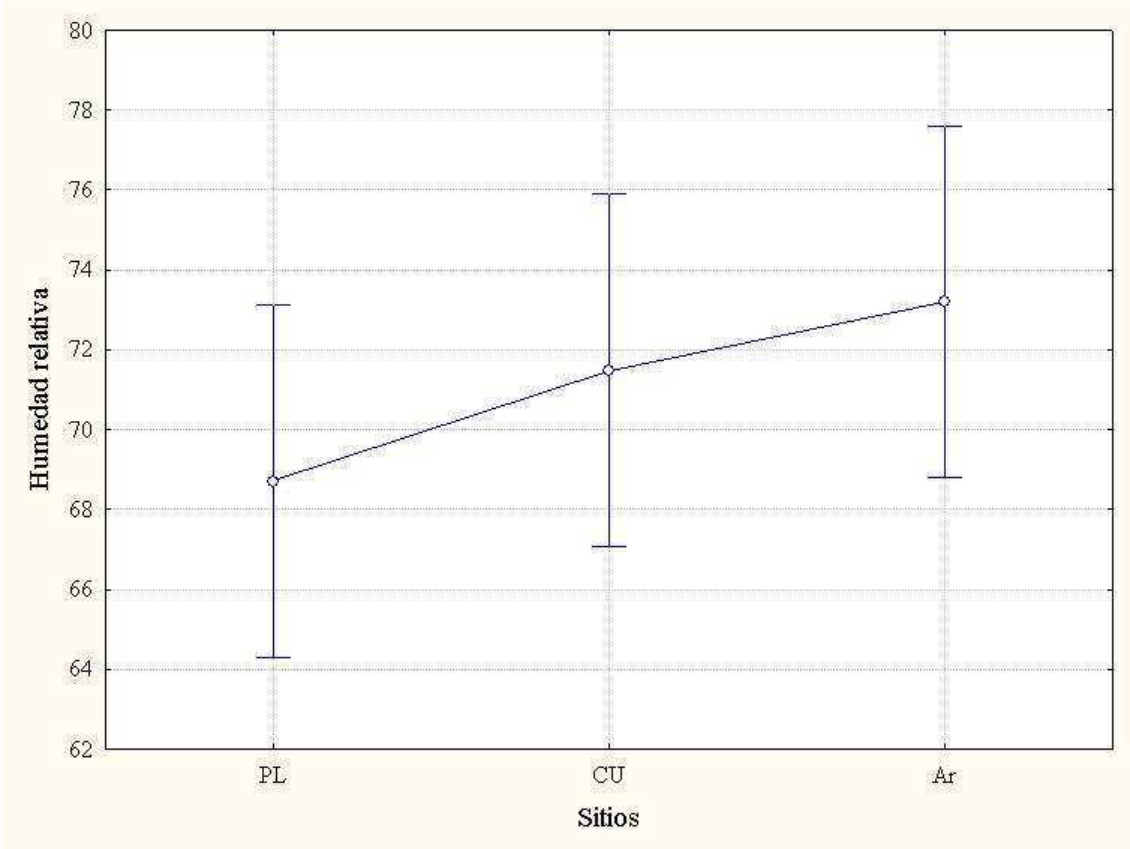
**Análisis de la varianza de un factor, Humedad relativa: No significativo para todos los sitios.**

**Tabla 2.6.2. Análisis de contraste a partir del Anova de 1 factor para la Humedad relativa (H.R.).**

Test de Tukey HSD; H.R.  
 Probabilidades aproximadas para los Test post hoc  
 Error: entre SM= 56,378, df = 33,00

	(1)	(2)	(3)
Sitios	68,712	71,485	73,203
1		0,641397	0,320457
2	0,641397		0,841788
3	0,320457	0,841788	

**Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.**



**Fig. 2.3. Gráfico del análisis del índice de Humedad relativa para los 3 sitios.**

***Evaluación de las diferencias de Temperatura entre los sitios***

El análisis de los datos de Temperatura a partir del ANOVA de 1 factor señala que las diferencias observadas entre los sitios son no significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2.7.1-.2 y Fig. 2.4), a pesar de que el sitio 3 tiene valores menores a los demás sitios.

**Tabla 2.7.1. Análisis de la varianza de 1 factores para la Temperatura.**

Sitios	Media de Temperatura	Error estándar	Temperatura - 95%	Temperatura +95%	N
1	18,13260	1,541543	14,99631	21,26889	12
2	18,32430	1,541543	15,18801	21,46060	12
3	17,52782	1,541543	14,39153	20,66412	12
Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	11657,40	1	11657,40	408,7986	0,000000
Sitios	4,15	2	2,07	0,0727	0,930007
Error	941,04	33	28,52		

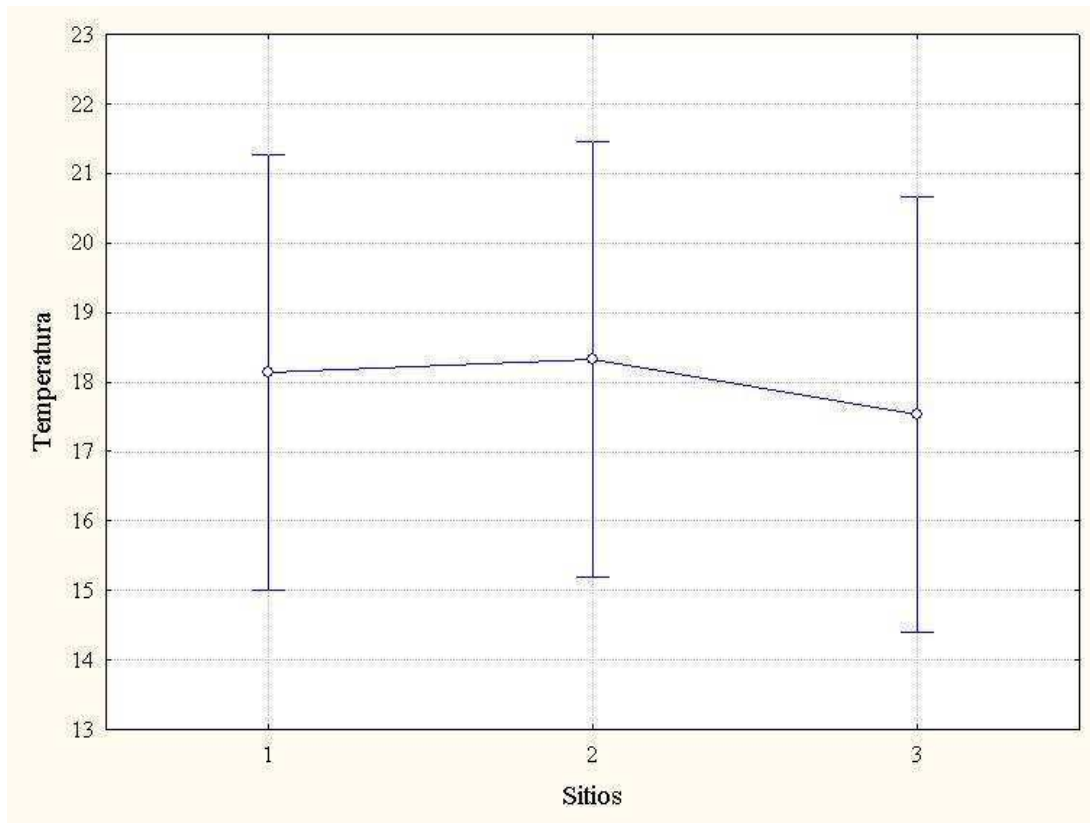
**Análisis de la varianza de un factor, Temperatura: No significativo para todos los sitios.**

**Tabla 2.7.2. Análisis de contraste a partir del Anova de 1 factor para la variable Temperatura.**

Test de Tukey HSD; Temperatura  
 Probabilidades aproximadas para los Test post hoc  
 Error: entre SM= 28,516, df = 33,00

Sitios	(1)	(2)	(3)
	18,133	18,324	17,528
1		0,995834	0,958612
2	0,995834		0,929317
3	0,958612	0,929317	

**Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.**



**Fig. 2.4** Gráfico del análisis del índice de Temperatura para los 3 sitios.

***Evaluación de las diferencias de Heliofanía entre los sitios 1 y 2***

Considerando los resultados encontrados entre los sitios en los análisis anteriores, donde se muestra que no habría diferencia entre ellos, se obtuvieron datos correspondientes a Heliofanía efectiva para estos sitios, para luego evaluar si los índices de radiación lumínica entre estos sitios revelaban alguna diferencia, entre sitios con características de reserva.

Mientras que los datos obtenidos muestran que el sitio 1 tiene un valor de heliofanía efectiva ligeramente mayor, el análisis de heliofanía a través de un análisis ANOVA de

1 factor, señala que las diferencias observadas entre los sitios 1 y 2 son no significativas ( $p > 0,05$ ), (Tabla 2.8; Fig. 2.5).

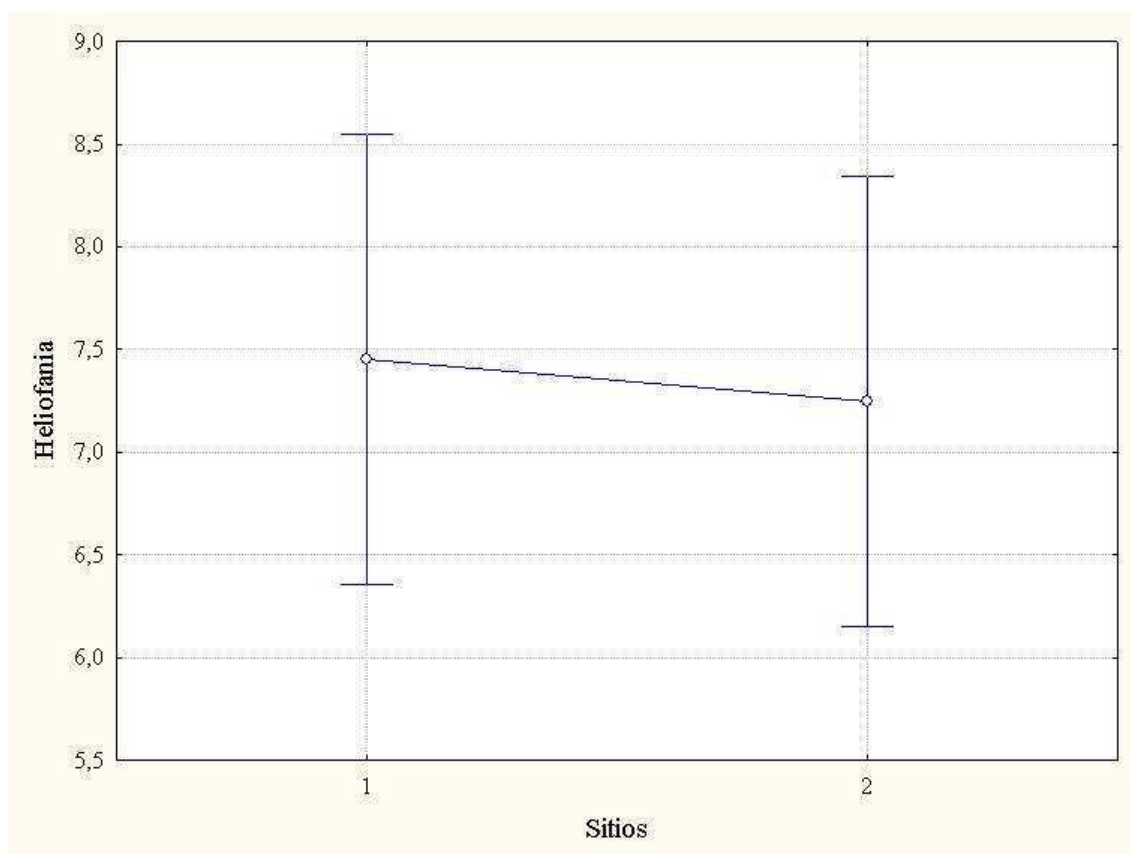
**Tabla 2.8. Análisis de la varianza de un factor para Heliofania efectiva.**

Sitios	Media de Heliofania	Error estándar	Heliofania -95%	Heliofania +95%	N
1	7,453816	0,527853	6,359116	8,548516	12
2	7,246724	0,527853	6,152024	8,341423	12

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	1296,64	1	1296,64	387,8027	0,000000
Sitios	0,26	1	0,26	0,0770	0,784048
Error	73,56	22	3,34		

**Análisis de la varianza de un factor, Heliofania: No significativo para todos los sitios.**



**Fig. 2.5. Gráfico de Heliofania para los sitio 1 y 2.**

El análisis de las diferencias observadas para la variable “Transformación”, a través de un análisis ANOVA de 1 factor, señala que las diferencias observadas entre los sitios no son significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2.9.1-.2 y Fig. 2.6). Sin embargo, a través de los datos se puede observar que el sitio 2 presentaría una mayor “Transformación” que los sitios 1 y 3.

**Tabla 2.9.1 Análisis de la varianza de 1 factor para el índice de Transformación.**

Sitios	Transformación	Error estándar	“Transformación” -95%	“Transformación” +95%	N
1	2,328	1,390	-0,524	5,179	10
2	3,877	1,390	1,026	6,729	10
3	1,312	1,390	-1,540	4,163	10

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado mínimo	F	p
Intercepción	188,32100	1	188,32100	9,75	0,004
Sitios	33,38510	2	16,69250	0,86	0,432
Error	521,45020	27	19,31300		

**Análisis de la varianza de un factor, “Transformación”: No significativo para todos los sitios.**

**Tabla 2.9.2. Análisis de contraste a partir del Anova de 1 factor del índice de Transformación.**

Test de Tukey HSD ;Transformación			
Probabilidades aproximadas para los Test post hoc			
Error: entre SM= 19,313, df = 27,00			
Sitios	(1)	(2)	(3)
1	2,3275	3,8772	1,3117
2		0,71323	0,863879
3		0,71323	0,404581
		0,863879	0,404581

**Test de Tukey: comparación de a pares de todos los sitios, se informa el valor de p.**



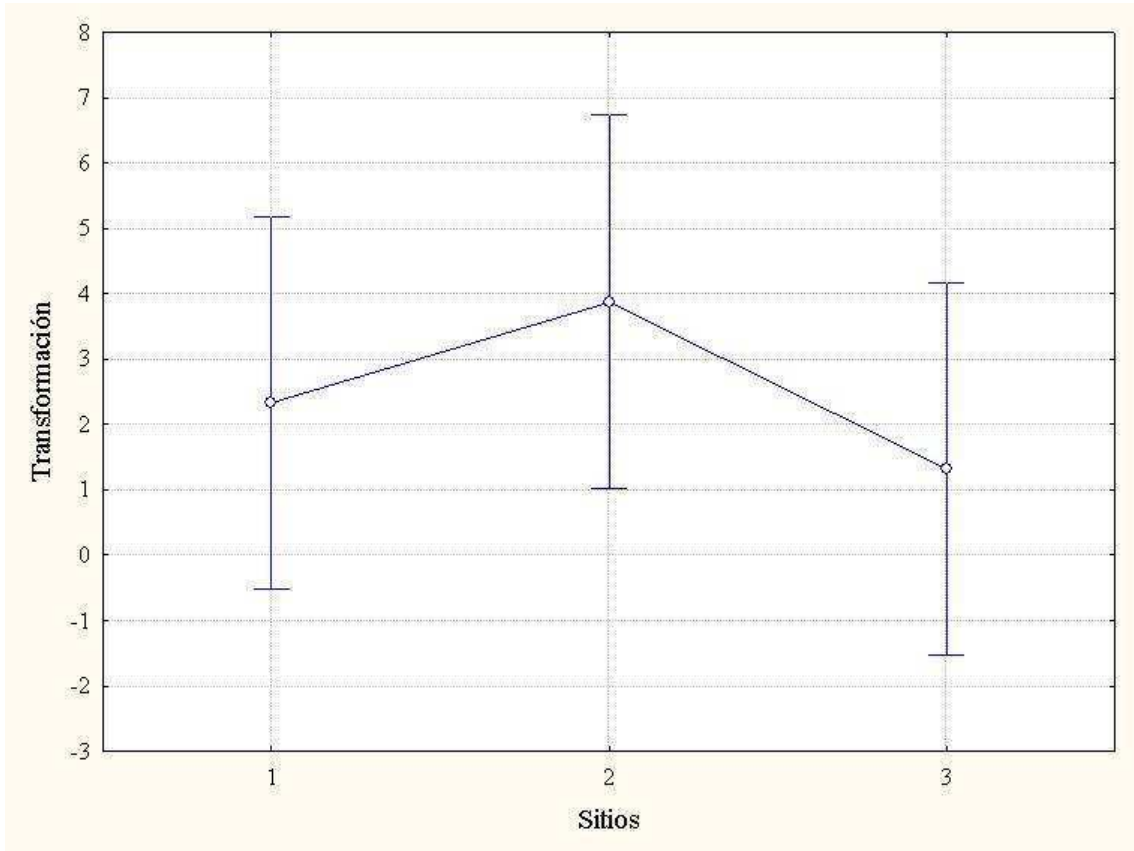


Fig. 2.6. Gráfico del análisis del índice de Transformación para los 3 sitios.

## Discusión

Los estudios sobre diversidad en vegetación arbórea, particularmente en endofitos foliares han tratado de dilucidar la disparidad observada en las comunidades endofíticas. Sin embargo pocos trabajos han identificado las causas de estos cambios. Algunos autores como Sun et al. (2011), plantean la especificidad de hospedante como posible factor en la determinación del ensamble fúngico. Sin embargo, Bahnweg et al. (2005) señalan que otros factores como, la exposición a la luz y el régimen de ozono afectarían las hojas de hayas, mientras que Botella et al. (2010) sugieren que la composición del suelo y la edad del árbol podrían explicar las variaciones en las especies. Por otro lado, algunos estudios remarcan que el genotipo del hospedante y sus propiedades químicas (Bálint et al. 2013) serían los responsables, mientras que otros trabajos consideran a la edad de la hoja y el régimen de precipitaciones (Lau et al. 2013) o diferencias geográficas (Vaz et al. 2013) como causantes de los cambios en la composición del ensamble fúngico endofítico.

Si las variables ambientales tienen un papel primordial en la distribución de los microorganismos, entonces los sitios evaluados anteriormente bajo la escala local planteada, deberían compartir comunidades de endofitos semejantes, sin embargo no es lo que se ha observado, y solo pocas especies son comunes a todos los sitios. Nuestros datos de diversidad, como el índice de Sørensen mostraron que las comunidades de la Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte eran más similares entre sí que con San Antonio de Areco.

El análisis de PCA basado en las especies mostró que tanto la Reserva Natural Punta Lara como la Reserva Ecológica Costanera Norte y San Antonio de Areco se

mantuvieron separadas entre sí en la distribución espacial, en cuanto a composición de especies. Por otro lado, las variables ambientales agruparon a la Reserva Natural Punta Lara y San Antonio de Areco como más similares entre sí, mostrando en el extremo opuesto a la Reserva Ecológica Costanera Norte. Considerando que la Reserva Natural Punta Lara y la Reserva Ecológica Costanera Norte tienen características de reservas, se esperaba encontrar menores valores de “transformación” en estos sitios. Sin embargo, los resultados indican que la Reserva Ecológica Costanera Norte está más asociado con valores mayores de disturbio, hecho que se podría esperar para San Antonio de Areco, la cual es una zona con gran influencia agrícola ganadera. Probablemente la gran influencia de la Ciudad de Buenos Aires la cual rodea a la misma en su totalidad, tiene peso suficientemente considerable para generar un nivel de “transformación” elevado aún siendo un lugar protegido. Los análisis de ANOVA realizados para las variables temperatura, humedad relativa y “transformación” de los 3 sitios indicarían que no hay diferencias significativas entre los sitios estudiados. Por lo tanto, estas variables ambientales y antrópica no pueden explicar las variaciones en los niveles de riqueza y diversidad de especies. Algún factor o factores no considerados en este estudio podrían estar teniendo influencia en los resultados obtenidos.

Considerando que el índice de “transformación” para medir el disturbio antrópico no mostró diferencias significativas, teniendo en cuenta que uno de los sitios tiene un alto grado de modificación y estos resultados entran en discordancia, posiblemente debería evaluarse un nuevo criterio o procedimiento para el cálculo del índice de “transformación”. Por lo que se debe buscar un índice de “transformación” o disturbio más óptimo, y que en lo posible contemple o que este conformado por más de un parámetro, que permita valorar más eficientemente el grado de disturbio antrópico en distintos ambientes.

Hasta aquí las variables ambientales evaluadas parecerían no tener una influencia tan importante sobre las comunidades microbianas en los sitios estudiado, sin embargo, los resultados obtenidos por Suryanarayanan et al. (2011) y U´ren et al. (2012) señalan lo contrario, indicando que estas variables tienen un papel importante.

Si bien los análisis estadísticos no son definitivos, las observaciones realizadas *in situ* en el presente trabajo reflejan una disminución en las comunidades endofíticas entre los sitios estudiados, que podría iría de la mano con la actividad antropogénica, hecho que señalaría que diferentes actividades humanas influirían sobre las comunidades fúngicas pudiendo afectar la diversidad a través de la diversidad y sus componentes.

¿A caso pequeñas variaciones de estos parámetros son suficientes para explicar los resultados observados? Si la respuesta es no. ¿Puede el disturbio antrópico proveer una explicación válida? ¿Puede la diversidad de endófitos fúngicos estar modulada en respuesta a este tipo de disturbio del hábitat, similar a lo que ocurre en otros organismos? (Gamboa and Bayman 2001; Tscharrntke et al. 2002). Una respuesta positiva a estas preguntas explicaría la disminución observada de la riqueza a medida que aumenta el disturbio antrópico del hábitat.

## *Capítulo 3*

---

# **Linajes de endofitos de *Blepharocalyx* *salicifolius* en relación al corredor biológico**

## Capítulo 3

# Linajes de endofitos de *Blepharocalyx salicifolius* en relación al corredor biológico

### Introducción

Los organismos dentro de un ecosistema viven íntimamente en contacto con su entorno, estableciendo interacciones con los distintos organismos que coexisten con ellos. De estas interacciones dependen muchos de los procesos biológicos fundamentales para mantener el equilibrio del ambiente y de su biodiversidad (Hoyos et al. 2010).

Durante el transcurso de las últimas décadas, el ser humano comenzó a tomar conciencia del protagonismo y de las responsabilidades que le conciernen en temas relacionados con la pérdida de la biodiversidad, la conservación de especies y los ambientes naturales. En este marco, la generación de datos sobre la calidad y tipo de biodiversidad presente en nuestros ambientes es importante tanto a nivel cultural como económico, debido a las posibles aplicaciones que podrían derivarse de estas. Lentamente se empieza a tener en cuenta a la biodiversidad como un bien de cuidado, irreparable e insustituible.

Algunos de los factores que tienen mayor influencia en la pérdida de biodiversidad son los cambios en el ambiente, principalmente los cambios en el paisaje producto de los efectos antrópicos negativos sobre comunidades naturales. Entre estos, se destaca la fragmentación de los hábitats (Fischer y Lindenmayer 2007) que da origen a islas pequeñas sin conexión entre sí. El alto grado de interés en estas causas y efectos de

estos cambios sobre los organismos ha promovido el desarrollo de estudios que abarquen nuevos puntos de vista que permitan entender las causas y efectos que estos cambios conllevan

Gran parte de las civilizaciones se iniciaron y prosperaron a la orilla de los ríos. Estos grandes flujos del agua transportan gran cantidad nutrientes, sedimentos suspendidos, semillas, huevos y numerosos organismos, que circulan, se reproducen y necesitan de los mismos para desplazarse.

Esta interconexión producida entre paisajes por los corredores contrarresta los efectos de la fragmentación en los ecosistemas. Dado que distintas estructuras de reproducción vegetales, y animales utilizan los corredores para transportarse, no sería inverosímil pensar que estos corredores fluviales proporcionen a los inóculos fúngicos una vía rápida para su dispersión. Estudios previos de endofitos en un conjunto de islas mostraron que el grado de interconexión de las islas repercutía sobre la frecuencias de los endofitos aislados, por lo tanto el grado de interconexión entre sitio es una factor a considerar (Helander et al. 2007). Sin embargo, otros trabajos evaluando el modo de dispersión y los factores que podrían afectarla (Johnson y Haddad 2011), revelaron que el corredor parecería tener influencia menor en la dispersión de las esporas, y por lo tanto en el mantenimiento de flujo genético y la formación del ensamble fúngico.

En Argentina existen varios cursos de agua que contribuyen a la dispersión de las especies. La cuenca del Rio de la Plata es una de las más importantes de sud América y del mundo en cuanto a su caudal y se encuentra entre los grandes sistemas fluviales del mundo (Latrubesse 2008). Esta cuenca está conformada principalmente por 3 grandes ríos: Paraná, Paraguay y Uruguay. La parte inferior de este sistema fluvial comprende el corredor biológico Paraná-Uruguay que proporciona conectividad entre paisajes, ecosistemas y hábitat naturales permitiendo el mantenimiento de la diversidad biológica

mediante el intercambio genético de especies y facilitando que se cumplan los ciclos biogeoquímicos que requieren de la continuidad del paisaje (Neiff et al. 2005).

Para testear la hipótesis sobre la influencia de los corredores biológicos en la dispersión del inoculo de los endofitos fúngicos, se eligió a *Colletotrichum* como endofito de estudio debido a que fue el taxón más frecuentemente identificado en las poblaciones de *B. salicifolius* de la Reserva Punta Lara y Reserva Ecológica Costanera Norte. A fin de establecer la posibilidad de que el inoculo fúngico circule por el corredor, se seleccionó la principal especie endofítica en los sitios ya evaluados en los capítulos anteriores y se incluyó en el estudio una nueva área. La zona seleccionada debió cumplir 2 requisitos importantes: 1) que fuera aledaño al sistema fluvial evaluado en este estudio y 2) que fuera una zona con características de reserva o sin procesos de importantes de modificación por parte del hombre. Por lo tanto se seleccionó el Parque Nacional El Palmar (sitio adicional), el cual está localizado en la margen del río Uruguay a 324 km río arriba del sitio 1.



## Objetivo

Evaluar marcadores moleculares para caracterizar linajes dentro de las poblaciones de especies fúngicas endofíticas.

Comparar mediante marcadores moleculares las poblaciones fúngicas y estudiar la influencia del corredor biológico sobre la dispersión de un grupo de taxones mediante análisis moleculares.

## Materiales y Métodos

### *Muestreo y aislamiento de endofitos fúngicos*

El muestreo y los aislamientos de las hojas de *Blepharocalyx salicifolius* se realizaron según lo descrito en el capítulo 1. Sin embargo en forma similar a lo ocurrido en el sitio 3 el muestreo estuvo sujeto a la disponibilidad del hospedante.

Hojas de *Blepharocalyx salicifolius* fueron muestreadas. Ocho arboles fueron seleccionados aleatoriamente cinco hojas de aspecto saludable, sin evidencia de síntomas de enfermedad fueron coleccionadas de cada uno. Esto último debido a que la mayoría de las hojas presentaban evidencia de síntomas de enfermedad.

El material fue transportado al laboratorio en bolsas de polietileno estériles y procesadas dentro de las primeras 24 a 48 horas de colección. Las hojas coleccionadas fueron lavadas con agua estéril y esterilizadas superficialmente por inmersión con la siguiente secuencia: 1 minuto en etanol 70 %, 2 min en una solución de lavandina al 4% (solución madre 5,5 g Cl/L), 30 segundos en etanol 50%. Luego de este proceso, 10 fragmentos

(0,25 cm<sup>2</sup>) por hoja fueron transferidos a cajas de Petri de 9 cm de diámetro, que contenían extracto de malta agarizado (MEA) sin utilización de antibióticos, debido a lo mencionado en el párrafo anterior se amplió el número de fragmentos evaluados para mantener la cantidad de fragmentos totales a evaluar. Las cajas se incubaron a 24° C por 6 semanas y examinadas periódicamente. Todo fragmento de micelio emergente fue aislado y transferido a cajas de Petri con MEA para la obtención de cepas puras, que se almacenaron a 4° C.

### ***Identificación fúngica***

Todos los aislamientos fueron repicados en Extracto de malta agarizado (MEA) o en Agar Papa Glucosado (APG). Los cultivos puros fueron examinados periódicamente hasta observar su esporulación hasta 30 días desde su siembra.

Las observaciones y las mediciones fueron llevadas a cabo de material fresco y montado en agua destilada, 5% de KOH o Floxina para microscopía óptica y en el reactivo de Melzer para observar reacción amiloide. Todas las estructuras micromorfológicas fueron observadas en microscopio estereoscópico Boeco BTB-3A (Alemania) y medidas con un aumento de 1000X en microscopio binocular Zeiss Axioskop (Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Olympus modelo C-5060 Wide Zoom 5,1 megapíxeles (Tokio, Japón). En los casos de cepas estériles, estas fueron cultivadas a 24° C con un ciclo de 12 horas de luz UV, para inducir la esporulación. Los cultivos que no produjeron esporulación dentro de los 40 días de incubación fueron designados como Micelio Estéril.

### ***Selección de cepas endofíticas previamente recuperadas***

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo 1 se analizaron las cepas que se aislaron en tres sitios asociados al corredor:

Debido a su importancia taxonómica como endofito foliar y dado que resultó ser el taxón más abundante, cepas seleccionadas al azar, del género *Colletotrichum* fueron elegidas para análisis filogenéticos. Un total de 20 cepas de endofitos foliares, obtenidas de los aislamientos realizados en el Capítulo 1 en los sitios 1 y 2, y 2 cepas pertenecientes al sitio adicional completaron del set de muestras a evaluar. Dado que en el sitio 3 no se aislaron cepas correspondientes al taxón *Colletotrichum* sp no se incluyeron para los análisis filogenéticos.

**Tabla 3.1. Datos de las cepas aisladas en este estudio para los análisis filogenéticos.**

Nº de Sitio	Nombre del Sitio	Código simplificado	Código aislamiento
1	Reserva Natural Punta Lara	1p	b s7h2(3)
1	Reserva Natural Punta Lara	2p	b s3h7(1)
1	Reserva Natural Punta Lara	3p	b s3h3(4)
1	Reserva Natural Punta Lara	4p	b s4h1(4)
1	Reserva Natural Punta Lara	5p	b s7p9(1)
1	Reserva Natural Punta Lara	6p	b3s7h7(5)
1	Reserva Natural Punta Lara	7p	b3s7h2(5)
1	Reserva Natural Punta Lara	8p	b s3h10(3)
1	Reserva Natural Punta Lara	9p	b s4h10(3)
1	Reserva Natural Punta Lara	10p	b s7p7(2)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	1	b2s7h1(2)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	2	b3s2p2(2)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	3	b1s5h5(2)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	4	b1s5h2(3)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	5	b1s5h3(5)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	6	b3s2hh10(2)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	7	b1s5h7(1)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	8	b2s7h3(1)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	9	b3s2h5(3)
2	Reserva Ecológica Costanera Norte	10	b1s5p4(3)
Adic.	Reserva Nacional El Palmar	P10	P10a1
Adic.	Reserva Nacional El Palmar	P19	P19a3

Localidades muestreadas separadas por colores, se seguirá el código simplificado y el patrón de colores para resaltar las cepas en los árboles filogenéticos.

### *Extracción de ADN*

Las cepas fueron cultivadas en medio extracto de malta sólido y Agar papa glucosado (en ambos casos agar al 2%) a 24°C en oscuridad, por 1 semana o hasta cubrir la caja. En los casos donde el micelio fúngico fue escaso o muy superficial y de difícil remoción del medio sólido, se utilizó el mismo medio en estado líquido. El micelio obtenido se homogenizó en eppendorfs de 2 ml utilizando triturador de tejidos estériles de 1,5/2 ml, Axygen 1 ml & 2 ml Pestle, Blue. Pre-esterilized.

Para la extracción de ADN nuclear se utilizó el UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories inc., Solana Beach, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras procesadas se amplificaron por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y se secuenciaron las siguientes regiones: ITS;  $\beta$ -Tubulina (TUB2); Actina (ACT); Calmodulina (CAL); Glutamina Sintetasa (GS); Glicer aldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH).

Las regiones anteriores fueron amplificadas por medio de los siguientes primers:

**ITS:** (internal transcribed spacer= espaciadores transcritos internos) ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990).

**Beta-Tubulina (TUB2):** Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass y Donaldson 1995).

**Actina (ACT):** ACT512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') y ACT783R (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3') (Johnston y Jones 1997).

**Calmodulina (CAL):** CL1 (5'-GARTWCAAGGAGGCCTTCTC-3') y CL2 (5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3') (Johnston y Jones 1997).

**Glutamina Sintetasa (GS):** GSF1 (5'-ATGGCCGAGTACATCTGG-3') y GSR1 (5'-GAACCGTCGAAGTTCCAC-3') (Guerber et al. 2003).

**Glicer aldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GDPH):** GDF1 (5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') y GDR1 (5'-GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT-3') (Peres et al. 2008).

**Tabla 3.2. Resumen de los genes y primers utilizados para los análisis filogenéticos.**

Genes	Primers		Tamaño de primers (pb)
	5'-3'	3'-5'	
<b>ITS</b>	ITS-1	ITS-4	500
<b>Actina</b>	Act-512	Act-736	200-250
<b>β-Tubulina</b>	bt2a	bt2b	400-450
<b>Calmodulina</b>	CL1	CL2	700
<b>GDPH</b>	GDF1	GDR1	200-250
<b>GS</b>	GSF1	GSR1	800-1000

**Listado de las 6 regiones génicas utilizados con sus respectivos primers y tamaños.**

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:

**ITS:** (1) 3 min a 94 °C; (2) 45 segundos a 94 °C (fase de desnaturalización); (3) 45 segundos a 53 °C (correspondiente a la fase de pegado del primer o “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.

**ACT y TUB2:** (1) 3 min. a 95° C; (2) 1 min. a 95° C; (3) 30 segundos a 52° C; (4) 1 min. a 72° C y (5) 10 min. a 72° C, los pasos del 2 al 4 se repitieron por 34 ciclos.

**CAL:** (1) 2,5 min a 94° C; (2) 30 segundos a 94° C; (3) 30 segundos a 50° C; (4) 30 seg. a 72° C y (5) 15 min. a 72° C, los pasos de 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos.

**GS y GPDH:** (1) 4 min a 94° C; (2) 45 segundos a 94° C; (3) 45 segundos a 60° C; (4) 1 min. a 72° C y (5) 10 min. a 72° C, los pasos de 2 al 4 se repitieron por 34 ciclos.

La reacción fue preparada de la siguiente manera:

- dNTPs 1  $\mu$ l (1 mM), de Primers 1 $\mu$ l (10 mM) cada uno,
- 0,5  $\mu$ l de Taq polimerasa por muestra (5 U/ $\mu$ l) (recombinante, Invitrogen, Brasil), MgCl<sub>2</sub> (1,8 $\mu$ l) a 50 mM
- Buffer de reacción (5  $\mu$ l) suministrado por el fabricante.
- Agregado de 2-5  $\mu$ l de ADN de la extracción a la mezcla de PCR.
- Agregado de agua ultra pura (miliQ).
- Volumen final de la mezcla de 50 $\mu$ l.

Cada vez que se realizó una amplificación por PCR se incluyó un control con los reactivos para PCR reemplazando el ADN por agua mQ.

Los productos de PCR se comprobaron a través de la electroforesis de alícuotas de 10 $\mu$ l de ADN con 3  $\mu$ l de Loading buffer conteniendo Gel Red (1:3) 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 8.0, H<sub>2</sub>O dd a 1000 ml.). El gel fue revelado en un trans-iluminador de luz UV, UVITEC (BXT-F15.M).

La cuantificación de los productos de PCR se realizó por medio de un fluorómetro Qbit (Invitrogen, USA) y el kit Qbit DNA High Sensitive y según lo indicado por el fabricante.

Los productos de la amplificación fueron purificados a través de un kit de purificación Ultra Clean-Up PCR Kit MoBio (MoBio Inc.). 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.

En el caso de presentarse ambigüedades en los picos del cromatograma, es decir dos picos en la misma posición, se utilizó la convención IUPAC para sustituciones nucleofílicas (Liebecq 1992).

### *Estudios filogenéticos*

Las secuencias obtenidas por el servicio de secuenciación fueron comparadas inicialmente con secuencias del GenBank a través del análisis 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. Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en el Banco de Datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).



**Tabla 3.3. Secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos.**

Taxa	Número de acceso al GenBank					
	ITS	TUB2	ACT	GAPDH	GS	CAL
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972605	FJ907434	FJ907424	FJ972571	FJ972586	FJ917501
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972612	FJ907439	FJ903188	FJ972576	FJ972595	FJ917506
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ247622	GQ849433	KC843554	KC843490	JQ247610	HM582006
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC244165	JX625193	KC843553	-	GU935822	JX009741
<i>Colletotrichum boninense</i>	GQ485597	JX625201	JX009583	KC843493	-	GQ849460
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX625172	KC244158	HM582001	GQ856742	-	-
<i>Colletotrichum boninense</i>	-	KC244156	GQ856774	JQ005240	-	-
<i>Colletotrichum boninense</i>	-	-	JQ005502	-	-	-
<i>Colletotrichum boninense</i>	-	-	JQ005510	-	-	-
<i>Colletotrichum euphoribiae</i>	-	KF777249	-	KF777133	-	-
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972602	-	-	FJ972579	FJ972592	-
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972603	-	-	FJ972577	FJ972593	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ972609	FJ907445	FJ907430	FJ972582	FJ972589	FJ917512
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-	-	-	JX010085	-
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972608	FJ907446	FJ907432	FJ972583	FJ972588	FJ917514
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972607	FJ907447	FJ907433	FJ972584	FJ972587	FJ917515
<i>Colletotrichum karstii</i>	JN715846	HM585428	JQ247653	HM585391	JQ247617	KC293695
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM585409	JQ005618	KC843558	HM585387	JQ247618	KC293693
<i>Colletotrichum karstii</i>	JX625157	JX625209	KC843560	KC843496	KC293775	HM582013
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC244166	-	JQ005568	KC843495	KC293773	HM582011
<i>Colletotrichum karstii</i>	JX625180	-	JQ005566	-	KJ813570	-
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC295235	-	KC533744	-	-	-
<i>Colletotrichum karstii</i>	-	KC244159	-	-	-	-
<i>Colletotrichum karstii</i>	-	JQ005624	-	-	-	-
<i>Colletotrichum karstii</i>	-	KC293652	-	-	-	-
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596292	JX010413	JX009433	JX010050	JX010103	JX009742
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596295	JQ005861	HQ596284	HQ596299	JX010084	JX009690
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010146	-	HQ596287	HQ596302	HQ596288	-
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	JQ005778	KF178590	JQ005841	KF178484	KF178605	-
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178464	KF178580	KF178566	KF178488	KF178607	-
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	-	JQ005862	KF178560	-	-	-
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	-	JX863674	-	JQ005308	-	-
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	-	JQ005655	-	-	-	-
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972613	FJ907438	FJ907423	FJ972575	FJ972596	FJ917505
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972614	FJ907437	FJ907422	FJ972574	FJ972597	FJ917504
<i>Colletotrichum spinosum</i>	KF178475	-	-	-	KF178621	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	-	-	-	GU228269	-	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	-	GU228171	-	GU228254	-	-
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972601	FJ907444	FJ907429	FJ972580	FJ972591	FJ917510
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972610	FJ907443	FJ907428	FJ972581	FJ972590	FJ917511
<i>G. tucumanensis</i> ( <i>C. falcatum</i> epitype)	FJ972606	GQ289454	JFJ907431	FJ972585	FJ972600	FJ917513

Se muestran los taxones comparados y los 6 genes utilizados con su número de acceso al GenBank

respectivo.

**Tabla 3.4. Secuencias de especies de *Colletotrichum* para la región evaluada ITS.**

Taxa	N° GenBank			
	ITS	Origen geografico	Hospedante	Referencia
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972605	Thailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972612	Thailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ247622	China	<i>Citrus medica</i>	Peng et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC244165	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	GQ485597	China	<i>Crinum asiaticum</i>	Yang et al. (2010)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX625172	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972602	Thailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972603	Thailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ972609	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972608	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972607	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JN715846	Colombia	<i>Rubus glaucus</i>	Afanador-Kafuri L.
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM585409	China	<i>Vanda</i> sp	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JX625157	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC244166	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JX625180	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC295235	Brasil	<i>Mangifera indica</i>	Lima et al (2013)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596292	-	-	Su et al. (2011)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596295	-	-	Su et al. (2011)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010146	USA	<i>Musa</i> sp	Weir et al (2012)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	JQ005778	-	-	O'connell et al. (2012)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178464	Holanda	<i>Cucumis sativus</i>	Damm et al.(2013)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972613	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972614	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum spinosum</i>	KF178475	Argentina	<i>Xanthium spinosum</i>	Damm et al.(2013)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972601	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972610	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>G. tucumanensis</i> ( <i>C. falcatum</i> epitype)	FJ972606	Indonesia	<i>Saccharum officinarum</i>	Prihastuti et al. (2009)

**Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.**

**Tabla 3.5. Secuencias de especies de *Colletotrichum* para el gen de  $\beta$ -Tubulina (Tub2).**

Taxa	N° GenBank			
	TUB2	Origen geografico	Hospedante	Referencia
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ907434	Tailandia	<i>coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ907439	Tailandia	<i>coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum boninense</i>	GQ849433	China	<i>Crinum asiaticum</i>	Yang et al. (2010)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX625193	China	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX625201	China	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC244158	China	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC244156	China	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum euphorbiae</i>	KF777249	Sud Africa	<i>Euphorbia</i> sp	Crous et al. (2013)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ907445	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ907446	Kenia	<i>coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ907447	Kenia	<i>coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM585428	China	<i>Vanda</i> sp	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ005618	Brasil	<i>Pachira aquatica</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JX625209	China	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC244159	China	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ005624	Alemania	<i>Gossypium hirsutum</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC293652	-	-	Liu et al. (2013)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010413	-	<i>Musa</i> sp	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum musae</i>	JQ005861	-	-	O'Connell et al. (2012)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178590	Australia	<i>Benincasa hispida</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178580	Japon	<i>Cucumis melo</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	JQ005862	-	-	O'Connell et al. (2012)
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	JX863674	India	<i>Bougainvillea</i> sp	Sharma y Shenoy (2013)
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	JQ005655	India	<i>Phyllanthus acidus</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ907438	Tailandia	<i>coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ907437	Tailandia	<i>coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	GU228171	India	<i>Capsicum frutescens</i>	Damm et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ907444	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ907443	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>G. tucumanensis</i> ( <i>C. falcatum</i> epitype)	GQ289454	Indonesia	<i>Saccharum officinarum</i>	Prihastuti et al. (2009)

**Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.**

**Tabla 3.6. Secuencias de especies de *Colletotrichum* para el gen de Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).**

Taxa	N° GenBank			
	GAPDH	Origen geografico	Hospedante	Referencia
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972571	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972576	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC843490	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC843493	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	GQ856742	China	<i>Crinum asiaticum</i>	Yang et al. (2010)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ005240	Japon	<i>Crinum asiaticum</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum euphorbiae</i>	KF777133	Sud Africa	<i>Euphorbia</i> sp	Crous et al (2013)
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972579	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972577	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ972582	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972583	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972584	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM585391	China	<i>Vanda</i> sp	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM585387	China	<i>Calanthe argenteo-striata</i>	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC843496	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC843495	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010050	USA	<i>Musa</i> sp	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596299	USA	<i>Musa</i> sp	Su et al. (2011)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596302	Tailandia	<i>Musa</i> sp	Su et al. (2011)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178484	Japon	<i>Cucumis melo</i>	Damm et al. (2013)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178488	Holanda	<i>Cucumis sativus</i>	Damm et al. (2013)
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	JQ005308	India	<i>Phyllanthus acidus</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972575	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972574	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	GU228269	India	<i>Capsicum frutescens</i>	Damm et al. (2009)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	GU228254	USA	<i>Phaseolus lunatus</i>	Damm et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972580	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972581	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>G. tucumanensis</i> ( <i>C. falcatum</i> epitype)	FJ972585	Indonesia	<i>Saccharum officinarum</i>	Prihastuti et al. (2009)

**Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.**

**Tabla 3.7. Secuencias de especies de *Colletotrichum* para el gen de Glutamina sintetasa (GS).**

Taxa	N° GenBank			
	GS	Origen geografico	Hospedante	Referencia
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972586	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972595	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ247610	China	<i>Citrus medica</i>	Peng et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	GU935822	-	-	Hong et al.
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972592	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum fruticola</i>	FJ972593	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ972589	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	JX010085	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972588	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ972587	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ247617	China	<i>Citrus sinensis</i>	Peng et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ247618	China	<i>Citrus reticulata</i>	Peng et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC293775	-	-	Liu et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC293773	-	-	Liu et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KJ813570	India	<i>Elettaria cardamomum</i>	Chowdappa y Chethana
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010103	USA	<i>Musa sp</i>	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010084	Kenia	<i>Musa sp</i>	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596288	-	-	Su et al. (2011)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178605	Japon	<i>Cucumis melo</i>	Damm et al (2013)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178607	Holanda	<i>Cucumis sativus</i>	Damm et al (2013)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972596	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ972597	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum spinosum</i>	KF178621	Argentina	<i>Xanthium spinosum</i>	Damm et al (2013)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972591	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ972590	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>G. tucumanensis (C. falcatum epitype)</i>	FJ972600	Indonesia	<i>Saccharum officinarum</i>	Prihastuti et al. (2009)

**Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.**

**Tabla 3.8. Secuencias de especies de *Colletotrichum* para el gen de Actina (ACT).**

Taxa	N° GenBank			
	ACT	Origen geografico	Hospedante	Referencia
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ907424	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ903188	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC843554	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	KC843553	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX009583	Japon	<i>Crinum asiaticum</i>	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	HM582001	Japon	<i>Crinum asiaticum</i>	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum boninense</i>	GQ856774	China	<i>Crinum asiaticum</i>	Yang et al. (2010)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ005502	Japan	<i>Crinum asiaticum</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ005510	Nueva Zelanda	<i>Dacrycarpus dacrydioides</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum euphorbiae</i>	KF777133	Sud Africa	<i>Euphoria</i> sp	Crous et al. (2013)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ907430	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ907432	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ907433	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ247653	China	<i>Citrus sinensis</i>	Peng et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC843558	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC843560	-	-	Tao et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ005568	Brasil	<i>Carica papaya</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	JQ005566	Colombia	<i>Passiflora edulis</i>	Damm et al. (2012)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC533744	Brasil	<i>Mangifera indica</i>	Lima et al. (2013)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX009433	USA	<i>Musa</i> sp	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596284	-	-	Su et al (2011)
<i>Colletotrichum musae</i>	HQ596287	-	-	Su et al (2011)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	JQ005841	-	-	O'Connell et al. (2012)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178566	Australia	<i>Benincasa hispida</i>	Damm et al. (2013)
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KF178560	Holanda	<i>Cucumis sativus</i>	Damm et al. (2013)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ907423	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ907422	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ907429	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ907428	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al. (2009)
<i>G. tucumanensis</i> ( <i>C. falcatum</i> epitype)	FJ907431	Indonesia	<i>Saccharum officinarum</i>	Prihastuti et al. (2009)

**Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.**

**Tabla 3.9. Secuencias de especies de *Colletotrichum* para el gen de Calmodulina (CAL).**

Taxa	N° GenBank			
	CAL	Origen geografico	Hospedante	Referencia
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ917501	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ917506	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Colletotrichum boninense</i>	HM582006	China	<i>Oncidium flexuosum</i>	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX009741	Japon	<i>Crinum asiaticum</i>	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum boninense</i>	GQ849460	China	<i>Crinum asiaticum</i>	Yang et al. (2010)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ917512	Italia	<i>Citrus sinensis</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ917514	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	FJ917515	Kenia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC293695	-	-	Liu et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	KC293693	-	-	Liu et al. (2013)
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM582013	China	<i>Vanda</i> sp	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum karstii</i>	HM582011	China	<i>Eria coronaria</i>	Yang et al. (2011)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX009742	USA	<i>Musa</i> sp	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum musae</i>	JX009690	Kenia	<i>Musa sapientum</i>	Weir et al. (2012)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ917505	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Colletotrichum siamense</i>	FJ917504	Tailandia	<i>Coffea arabica</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ917510	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>Glomerella acutata</i>	FJ917511	Australia	<i>Carica papaya</i>	Prihastuti et al (2009)
<i>G. tucumanensis</i> ( <i>C. falcatum</i> epitype)	FJ917513	Indonesia	<i>Saccharum officinarum</i>	Prihastuti et al (2009)

**Números de acceso al GenBank, orígenes geográficos y hospedantes.**

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

Las secuencias de ADN fueron editadas y se construyó la matriz principal de secuencias a través del programa BioEdit sequence alignment editor, versión 7.2.0 (Hall, 1999). En este programa se manipularon las secuencias y el alineamiento se realizó a través del programa Clustal W Multiplealignment versión 1.4, con un número de Bootstrap de

1000. Se evaluaron distintos valores para los costos de apertura y extensión de gaps, valores default 3 y 2, respectivamente, 6 y 3 respectivamente, y 15 y 6 respectivamente. En las tablas 3.3 se detallan las secuencias del GenBank que fueron comparadas con las secuencias obtenidas en este trabajo. Una secuencia de *Glomerella tucumanensis* (*Colletotrichum falcatum*) se utilizó como grupo externo (outgroup) en todos los análisis. Los nombres de las especies a las que pertenecen las secuencias se mantuvieron tal como aparecen en el GenBank.

### **Método de máxima parsimonia**

Las hipótesis filogenéticas fueron construidas bajo el método de máxima parsimonia por medio del programa MEGA versión 6.0. Se asignó el mismo peso a todos los caracteres y los espacios (gaps) se consideraron información pérdida (missing gap). Se utilizaron como parámetros: 250 RAS (random addition sequence) y 10000 árboles máximos en memoria. El soporte de cada clado fue calculado mediante el método de Bootstrap con los siguientes parámetros: 500 réplicas.

### **Máxima verosimilitud**

En el programa Mega versión 6 (Tamura et al. 2013) se evaluó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a cada matriz obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 3.11). Se cargaron las matrices las armadas y se eligió el modelo evolutivo que se ajustara mejor para cada matriz previo al análisis de máxima verosimilitud (ML).



El análisis se realizó bajo los siguientes parámetros:

- Test de filogenia= bootstrap
- n° de réplicas de bootstrap= 500
- Modelo de sustitución el correspondiente a cada gen (Fig. 3.11)
- n° de categorías discretas gamma= 6
- Gaps= deleción parcial
- Método heurístico= SPR nivel 5
- Árbol inicial para ML= default NJ/bioNJ
- Filtro de swapeo de ramas = muy fuerte

### **Inferencia Bayesiana**

El análisis bayesiano se realizó a través del programa MrBayes versión 3.1.2. (Ronquist et al. 2012). Los archivos fueron previamente transformados al formato Nexus con el programa Mesquite 2.75 (build 5.6.4) (Maddison & Maddison, 2011).

- Se configuró el programa siguiente manera:
- Lset nst= 6 rates= invgamma
- Mcmc ngen= 5.000.000 samplefreq= 5000
- 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. Esta configuración fue la recomendada según lo indicado en el manual de MrBayes para la mayoría de los análisis, el cual se adapta

mejor a la mayoría de los caso de estudio. El análisis se realizó 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 DrawingTool - FigTree versión 1.3.1 (Rambaut, 2009) – Corel X5 para visualizar y editar los árboles resultante.

## Resultados

### *Caracterización de endofitos foliares*

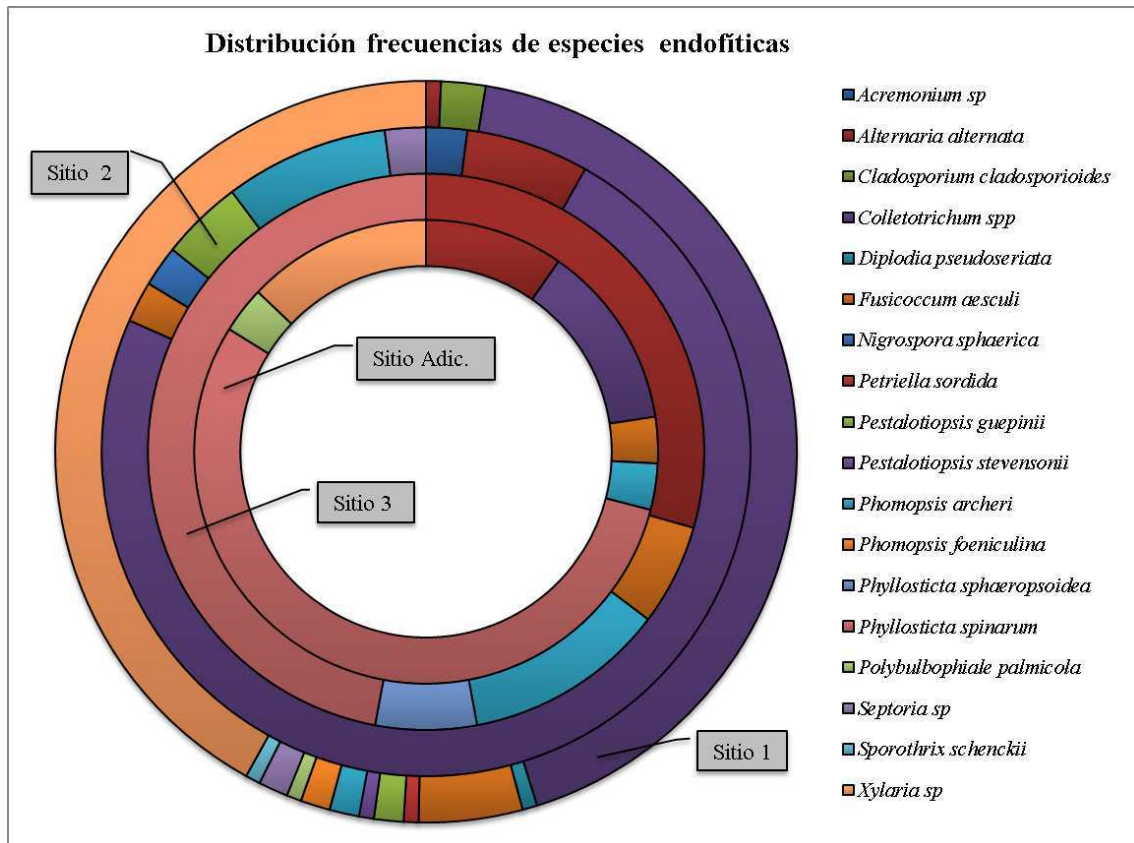
**Sitio Adicional:** Reserva Nacional El Palmar

De los 400 fragmentos evaluados en este sitio se obtuvieron 107 aislamientos. Estos fueron agrupados en 6 morfotipos y se identificaron 6 especies. El género *Phyllosticta* fue el más abundante en este sitio, dentro del cual se reconoció 1 especies: *Phyllosticta spinarum* (Nag Raj & M. Morelet). Los taxones que presentaron mayor frecuencia de aislamientos fueron *P. spinarum* (15,9 %), *Colletotrichum* sp (3,74 %), *Xylaria* (3,74 %) *Alternaria alternata* (2,8 %), mientras que las especies con bajas frecuencias fueron *Fusicoccum aesculi* (0,93 %) *Phomopsis archeri* (0,93 %) y *Polybulbophiale pamicola* (2,56 %) (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1.** Frecuencia relativa de aislamientos de endofitos fúngicos en el sitio adicional (Reserva Nacional El Palmar) a partir de la especie arbórea *Blepharocalyx salicifolius*.

Cabe remarcar nuevamente que las 3 especies que fueron encontradas en los sitios evaluados en Capítulo 1, fueron registradas en el sitio adicional. Por lo tanto las especies *Alternaria alternata*, *Fusicoccum aesculi* y *Phomopsis archeri* fueron registradas en los 4 sitios evaluados en esta tesis (Tabla 3.1). Por otro lado, la especie *Polybulbophiale palmicola* solo fue registrada en este sitio, siendo previamente registrada por Goh y Hyde (1998) en el género *Licuala* sp en Brunei, por lo que este es el primer registro en la especie *Blepharocalyx salicifolius* y el primer registro para Argentina.



**Fig. 3.2.** Diagrama general comparativo de diversidad en base a las frecuencias relativas de los aislamientos de endofitos fúngicos en los 4 sitios evaluados, representando los 18 taxones identificados. Sitio 1 = Reserva Natural Punta Lara, Sitio2 = Reserva Ecológica Costanera Norte, Sitio 3= San Antonio de Areco, Sitio Adicional= Parque Nacional El Palmar.

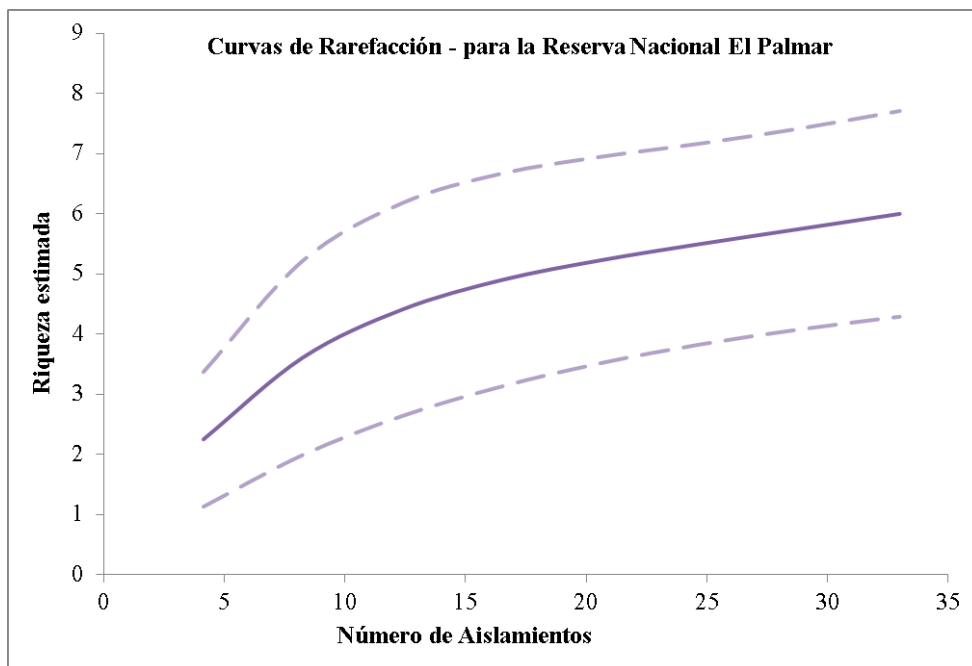
**Tabla 3.10 Lista de las especies fúngicas endofíticas aisladas de los 4 sitios de muestreo.**

Taxones	Hospedante: <i>Blepharocalix salicifolius</i>			
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio adicional
<i>Acremonium sp</i>	-	0,61	-	
<i>Alternaria alternata</i>	0,41	1,82	12,82	2,80
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,23		-	-
<i>Colletotrichum spp</i>	27,05	21,82	-	3,74
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	0,41		-	-
<i>Fusicoccum aesculi</i>	2,87	0,61	2,56	0,93
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	0,61	-	-
<i>Petriella sordida</i>	0,41		-	-
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	0,82	1,21	-	-
<i>Pestalotiopsis stevensonii</i>	0,41		-	-
<i>Phomopsis archeri</i>	0,82	2,42	5,13	0,93
<i>Phomopsis foeniculina</i>	0,82	-	-	-
<i>Phyllosticta sphaeropsoidea</i>	-	-	2,56	-
<i>Phyllosticta spinarum</i>	-	-	20,51	15,89
<i>Polybulbophiale palmicola</i>	-	-	-	0,93
<i>Septoria sp</i>	0,82	0,61	-	-
<i>Sporothrix schenckii</i>	0,41	-	-	-
<i>Xylaria sp</i>	26,64	-	-	3,74
Micelio Esterilia	36,89	70,30	56,41	71,03

Sitio 1 = Reserva Natural Punta Lara; Sitio2 = Reserva Ecológica Costanera Norte; Sitio 3 = San Antonio de Areco. Sitio Adicional = Reserva Nacional El Palmar. Valores expresados en porcentaje. Se remarcan las 3 especies comunes a los 3 sitios.

### ***Curvas de Acumulación de especies y Estimadores de riqueza***

La curva de acumulación de especies para el sitio adicional muestra que en este caso tampoco se logra alcanzar la asíntota, al igual que para los sitios vistos en el capítulo 1. Los estimadores de riqueza más estables correspondieron a Chao1 y Jack1, mientras que los índices de diversidad mostraron valores que se ubicaron cercanos a los obtenidos en el sitio 2.



**Fig. 3.3.** Curva de acumulación de especie endofíticas para el sitio adicional (Reserva Natural El Palmar). Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza (95 %).

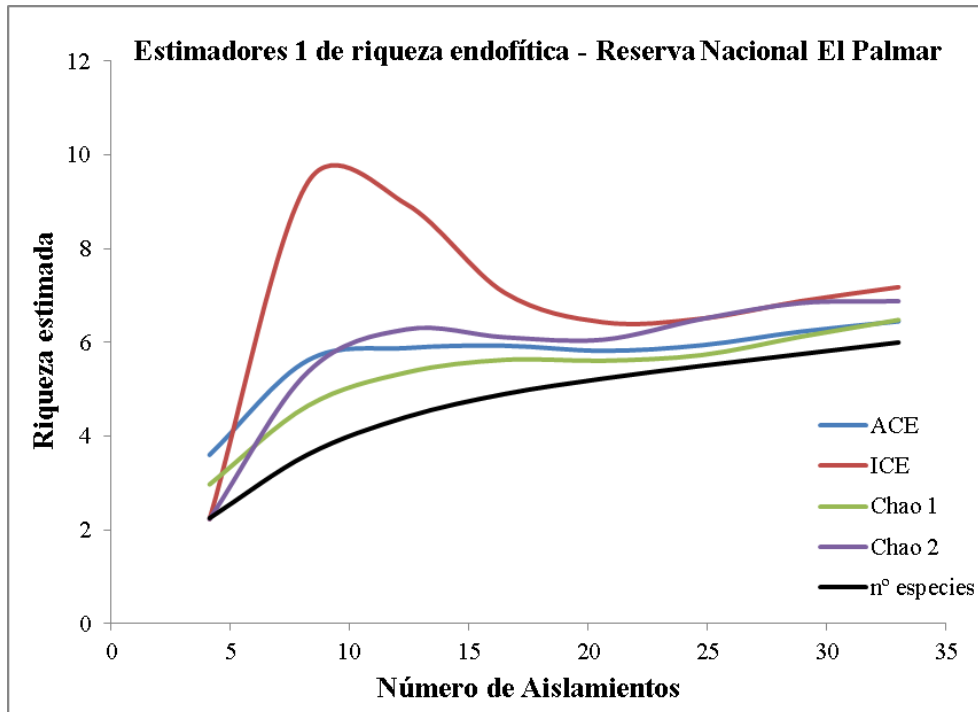


Fig. 3.4. Comportamiento de los Estimadores 1 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio adicional. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).



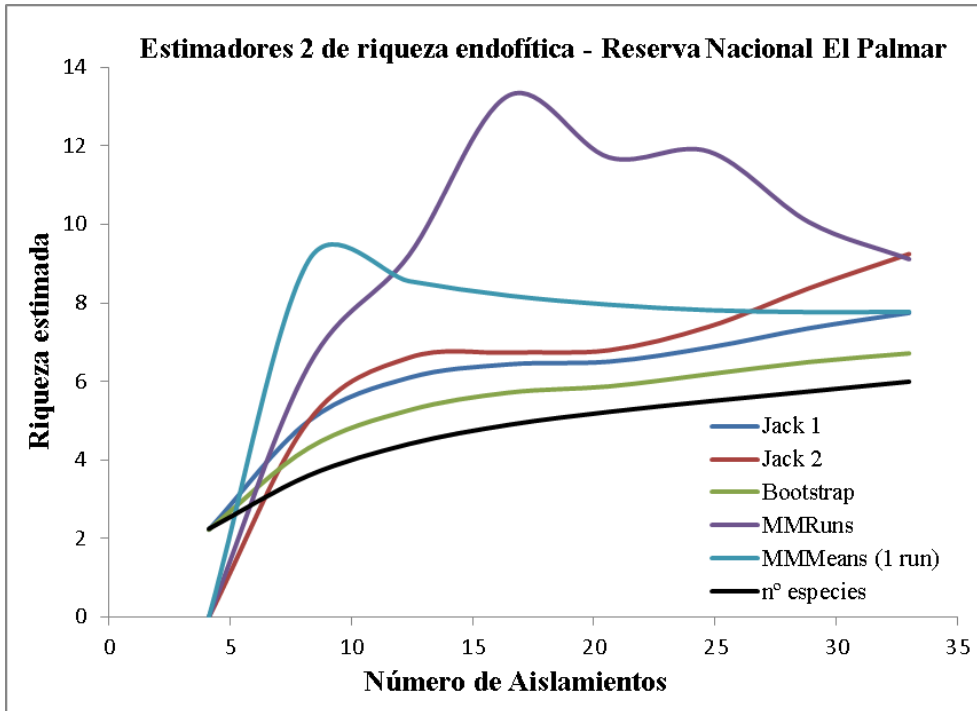


Fig. 3.5. Comportamiento de los Estimadores 2 de riqueza en función del número de aislamientos para el Sitio adicional. Con propósitos de comparación se grafica la curva de acumulación de especies (n° especies).

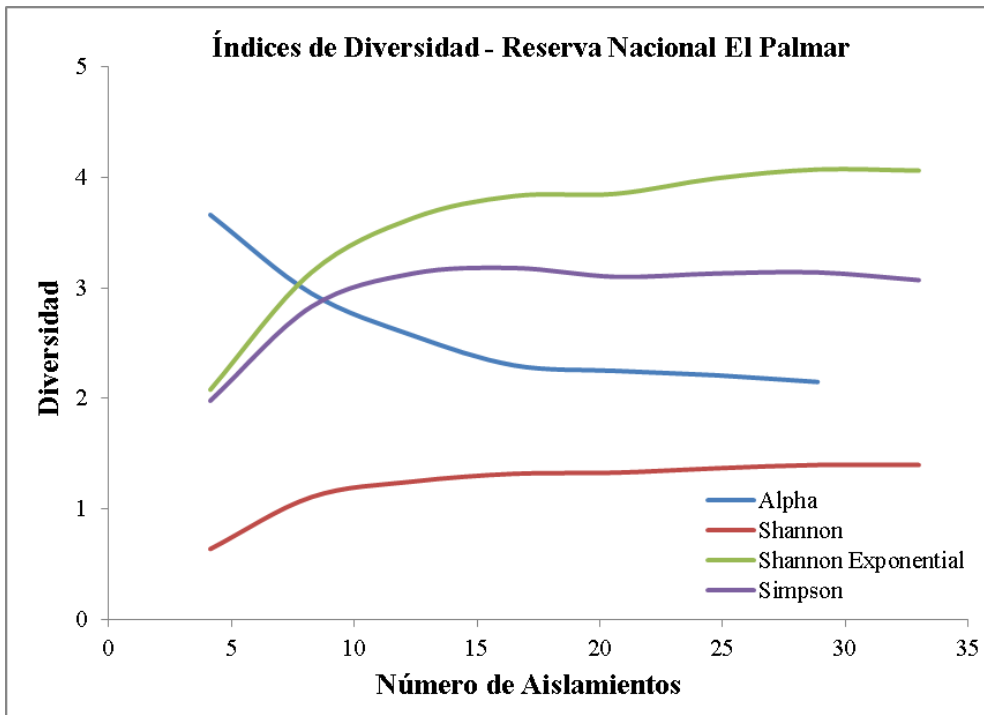


Fig. 3.6. Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función del número de aislamientos para el Sitio adicional.

### *Estudios filogenéticos*

A partir de los fragmentos analizados de las poblaciones de *B. salicifolius* de los 4 sitios, se evaluaron para el análisis 28 cepas de las 106 correspondientes al género *Colletotrichum* (26,4 % de las cepas disponibles). De estas 28 debido a la nula amplificación de algunas de las cepas, 22 cepas quedaron disponibles para incluir en los estudios filogenéticos.

De las 22 cepas evaluadas, 10 correspondieron al sitio 1, 10 al sitio 2 y 2 al sitio adicional. En este último caso, sólo 2 cepas pudieron ser secuenciadas para todos los genes, debido a que no se pudieron amplificar, aun cuando las muestras mostraron una cantidad normal de ADN, lo cual se corroboró con un método fluorométrico (Qbit). Se realizaron un total de 288 amplificaciones.

Para el sitio 1 se realizó un total de 96 amplificaciones para la región de ITS, para el gen de Actina 24 amplificaciones, para  $\beta$ -Tubulina 24 amplificaciones, para Calmodulina 72 amplificaciones, para Glutamina Sintetasa 24 amplificaciones y para Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa 24 amplificaciones, contabilizando un total de 264 amplificaciones para el sitio 1. Para el sitio 2, se realizaron 96 amplificaciones para ITS, 24 amplificaciones para el gen de Actina, 24 amplificaciones para  $\beta$ -Tubulina, 96 amplificaciones para Calmodulina, 24 para Glutamina Sintetasa y 24 amplificaciones para Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, contabilizando un total de 288 amplificaciones, mientras que para el sitio adicional, para ITS se realizó un total de 24 amplificaciones, para el gen de Actina 8 amplificaciones, para  $\beta$ -Tubulina 8 amplificaciones, para Calmodulina 24 amplificaciones, para Gliceraldehido 3-fosfato

deshidrogenasa 8 amplificaciones y para Glutamina Sintetasa 8 amplificaciones, contabilizando un total de 80 amplificaciones.

Se obtuvieron un total de 123 secuencias correspondientes a las cepas seleccionadas del género *Colletotrichum*. 22 correspondientes de las regiones ITS1-4, 22 para Actina, 22 para B-tubulina, 22 para Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, 22 para Glutamina Sintetasa y 13 secuencias para el gen de Calmodulina.

La comparación de los costos para apertura y extensión de gaps reveló que los valores de 15 y 6 respectivamente resultaron ser los que menor tiempo de ejecución provocaban en los programas, costos menores de los mismos provocaron extensiones considerables en los tiempos de ejecución de los programas de filogenia.

A partir de la determinación del modelo evolutivo utilizando el programa MEGA 6 se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 3.11). Estos modelos fueron utilizados en el análisis de Máxima verosimilitud. En el caso de la Inferencia Bayesiana se utilizó la configuración que mejor se ajusta a la mayoría de las muestras.

**Tabla 3.11 Modelo evolutivo de mejor ajuste para cada matriz evaluada.**

<b>Matriz de genes</b>	<b>Modelo Evolutivo</b>	<b>BIC obtenido</b>	<b>Nº de Secuencias (utilizadas/totales)</b>
ITS	K2+G	7523567	22/49
Actina	K2+G	4.060.593	22/51
$\beta$ -Tubulina	K2+G+I	5.020.646	22/52
Calmodulina	K2+G	11.953.867	13/32
GDPH	HKY+G+I	5.601.486	22/53
GS	T92+G	17.177.325	22/48

**Test de Modelo evolutivo a partir del análisis con el programa Mega 6. Distribución gamma (G):** tasa de variación gamma distribuida entre sitios. **Proporción de sitios invariables (I):** extensión de los sitios estáticos, sitios no cambiantes en el conjunto de datos. **K2:** base de frecuencias iguales, una tasa de transición y una tasa de transversión. **HKY:** base de frecuencias variables, una tasa de transición y una tasa de transversión. **T92:** base de frecuencias variables, tasas iguales transversión, las tasas de transición variables. El valor de BIC fue el menor obtenido para cada gen y es el que usa de parámetro para la selección del modelo más adecuado.

### *Análisis de similitud por Blast*

Para la región ITS, las secuencias de cepas endofíticas correspondientes al sitio 1 mostraron una similitud de 90-96 de Query coverage (Qc) y una identidad (Id) de entre 96-99 % con cepas correspondientes a la especie *Colletotrichum boninense* y con valores menores a algunas cepas de *Colletotrichum karstii*. El sitio 2 mostraron una similitud de entre 84-96 de Qc y una Id del 94-99 %, con cepas pertenecientes al género *C. karstii*, en algunos casos estas cepas mostraron similitud a *C. boninense*. La única cepa correspondiente al sitio adicional que pudo ser amplificadas para la región ITS, mostró un Qc de 81 % y una Id del 99 % tanto con cepas de *C. boninense* como de *C. karstii*.

Para el gen de  $\beta$ -Tubulina, las cepas endofíticas del sitio 1 mostraron un valor de Qc de 95 % y una Id de 99% con cepas de *C. karstii*, mientras que las cepas del sitio 2 mostraron valores de Qc de 94-98 % y una Id de 99%. Las cepas del sitio adicional mostraron valores distintos, la cepa P10 tuvo valores de 94% de Qc y 99% de Id con cepas de *C. karstii*, mientras que P19 tuvo valores de 86% de Qc y 96% de Id con *C. euphorbiae*, y con valores menores principalmente con *C. karstii*.

Para el gen de Calmodulina, las cepas del sitio 1 registraron 95% Qc y 98% de Id, para el sitio 2 se obtuvo un valor de 95% de Qc y 99% de Id, en ambos casos las cepas mostraron similitud con la especie *C. karstii*.

El gen de Actina, mostro valores fueron de 94% Qc y 93-99% de Id con *C. boninense* para el sitio 1, mientras que para el sitio 2 se registraron valores de 95-97% Qc y 99% de Id y se asociaron tanto con cepas de *C. boninense* como de *C. karstii*. Para el sitio adicional, la cepa P10 mostro un Qc de 89% y 98% de Id, mientras que P19 valores muy bajos de Qc.

Se registraron para el gen GDPH valores de 92-96% de Qc y 99% de Id con la especie *C. boninense* para el sitio 1. Mientras que para el sitio 2, 97-98% de Qc, 99% de Id con la especie *C. karstii*. Las cepas del sitio adicional se mostraron distintas, P10 registró 99 % de Qc y 99% de Id con la especie *C. karstii* y P19 un Qc de 60% y 95 de Id.

Para el gen GS, el sitio 1 reveló valores de 93-95% de Qc y 96-99% de Id con la especie *C. karstii*, y con menores valores con la especie *C. karstii*. En el sitio 2 se registró 91-95% de Qc y 99% de Id con cepas de *C. karstii*, mientras que para el sitio adicional los valores fueron para la cepa P10 de 97-98% de Qc y 98-99% de Id con la especie *C. karstii*, y con menores valores con cepas de *C. boninense*, mientras que para P19 valores de Qc de 90% y 82% de Id con cepas de *C. karstii*.

## ***Análisis Filogenéticos***

### *Región ITS*

Se obtuvieron 153 caracteres informativos en las 49 secuencias incluidas en el análisis. El análisis mediante máxima parsimonia dio como resultado 12 árboles filogenéticos ( $L = 361$ ;  $Ci = 0,654$ ;  $Ri = 0,848$ ) (tabla 3.12). Las secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas durante este trabajo se ubicaron en 2 clados, uno compuesto por las cepas 10, 5p, 4, P10, 6, 5, 7, 1, 1p, y 2 y el otro por 2p, 7p, 10p, 8, 9, 8p, 3p, 3, 6p, 9 y 4p ambos con bajo soporte de Bootstrap (<50 %), estos agrupamientos obtenidos muestran que las cepas argentinas corresponden a *C. karstii* y *C. boninense* respectivamente. (Bootstrap 97%) (Fig. 3.7).

Al realizar el análisis bajo *inferencia bayesiana*, se realizaron 3 corridas con 8.000.000 generaciones, descartando luego el 25% de los árboles. Las secuencias estudiadas en este trabajo que aparecen formaron un clado con *Colletotrichum karstii* correspondieron a las cepas 1, 1p, 2, 7, 6, 5; 4, 5p, 10 y P10, las cuales registraron un alto soporte de probabilidad *a posteriori* de entre 0,97 y 1. Mientras que las cepas 2p, 8, 9, 3p, 7, 3, 6p, 9p, 4p, 8p y 10p aparecen agrupadas en un clado junto con secuencias correspondientes a la especie *Colletotrichum boninense* (Fig. 3.8). Estos agrupamientos son similares a los obtenidos por parsimonia. El análisis bajo Máxima verosimilitud mostró gran similitud con el observado por el análisis de inferencia bayesiana, a excepción de las cepas 7p, 2p, 8 y 9 que quedan por fuera del clado correspondiente a *C. karstii* (Fig. 3.9).

**Tabla 3.12. Parámetros obtenidos en el análisis de parsimonia en MEGA 6.**

<b>Análisis de Parsimonia</b>	<b>N° de árboles encontrados</b>	<b>Largo del árbol</b>	<b>Sitios Informativos</b>	<b>CI</b>	<b>RI</b>
<b>ITS</b>	4	361	153/485	0,654	0,848
<b>Actina</b>	21	330	181/244	0,712	0,895
<b>β-Tubulina</b>	158	297	158/454	0,605	0,82
<b>Calmodulina</b>	48	714	395/718	0,794	0,893
<b>GDPH</b>	93	365	197/253	0,614	0,869
<b>GS</b>	36	1379	720/1016	0,63	0,847
<b>6 Genes</b>	60	574,3	2463	0,67	0,86

Se informa los números de árboles más parsimoniosos; Los árboles más cortos encontrados y su promedio; El número de sitios informativos sobre el total y la sumatoria de los sitios informativos para el set de 6 genes; Los índices de consistencia (CI), retención (RI) y el promedio de los 6 genes estudiados.

A continuación se muestran los árboles obtenidos.

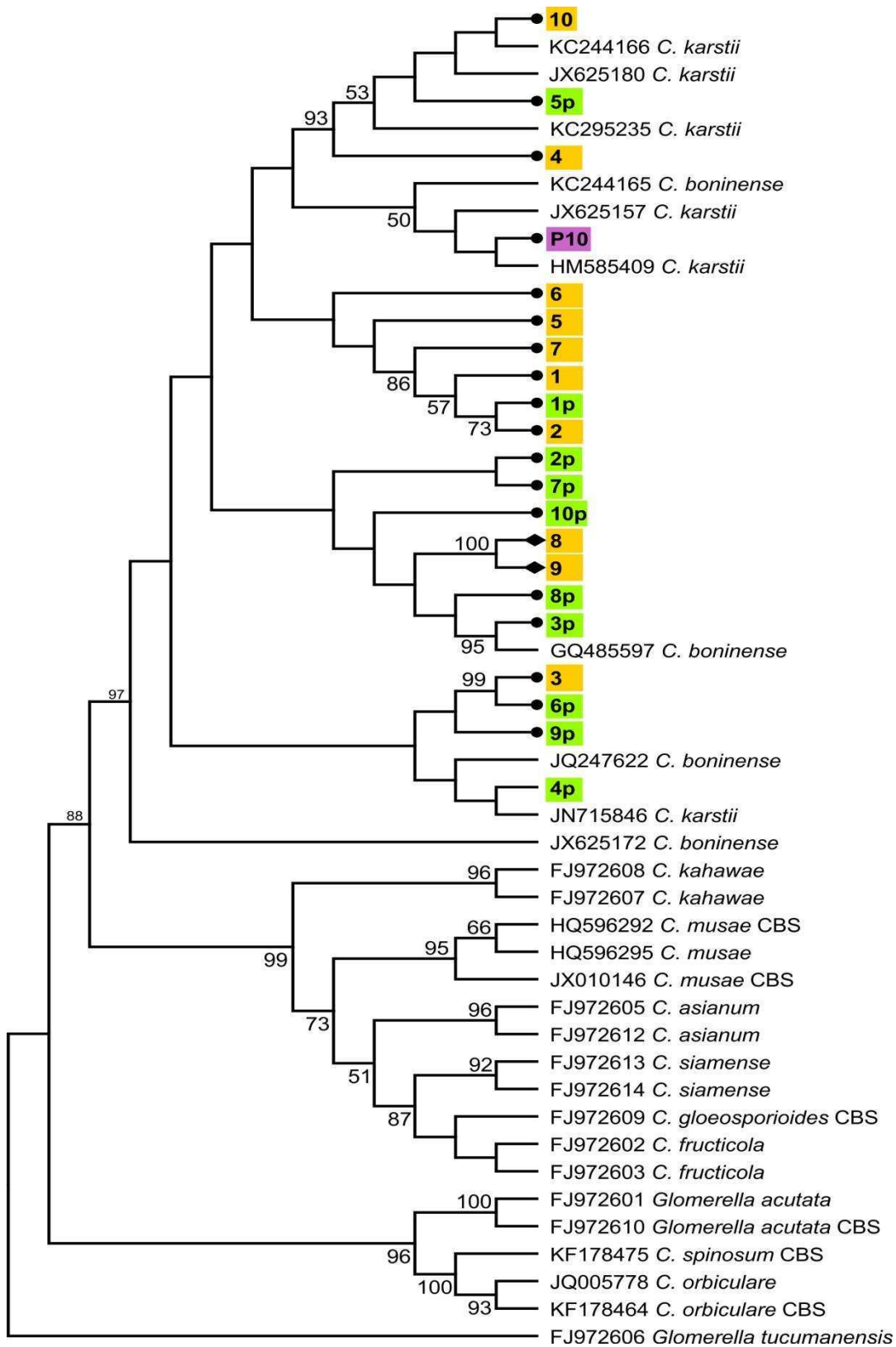


Fig. 3.7. Árbol consenso obtenido a partir de secuencias de la región ITS, para la secuencias endofíticas obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia en MEGA 6. En las ramas se muestran los soportes de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.



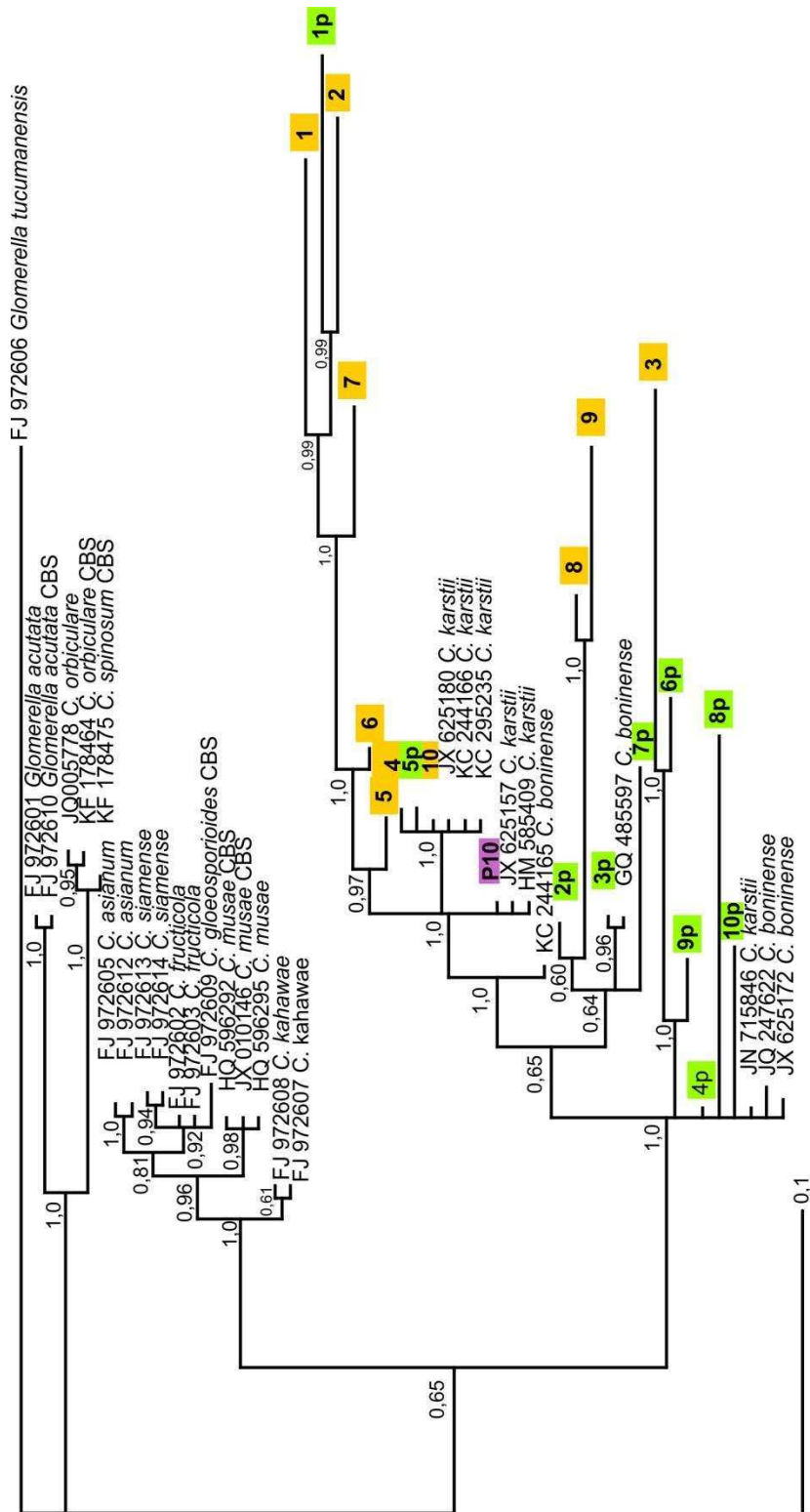


Fig. 3.8. Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones ITS a partir de 21 secuencias. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y los valores mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

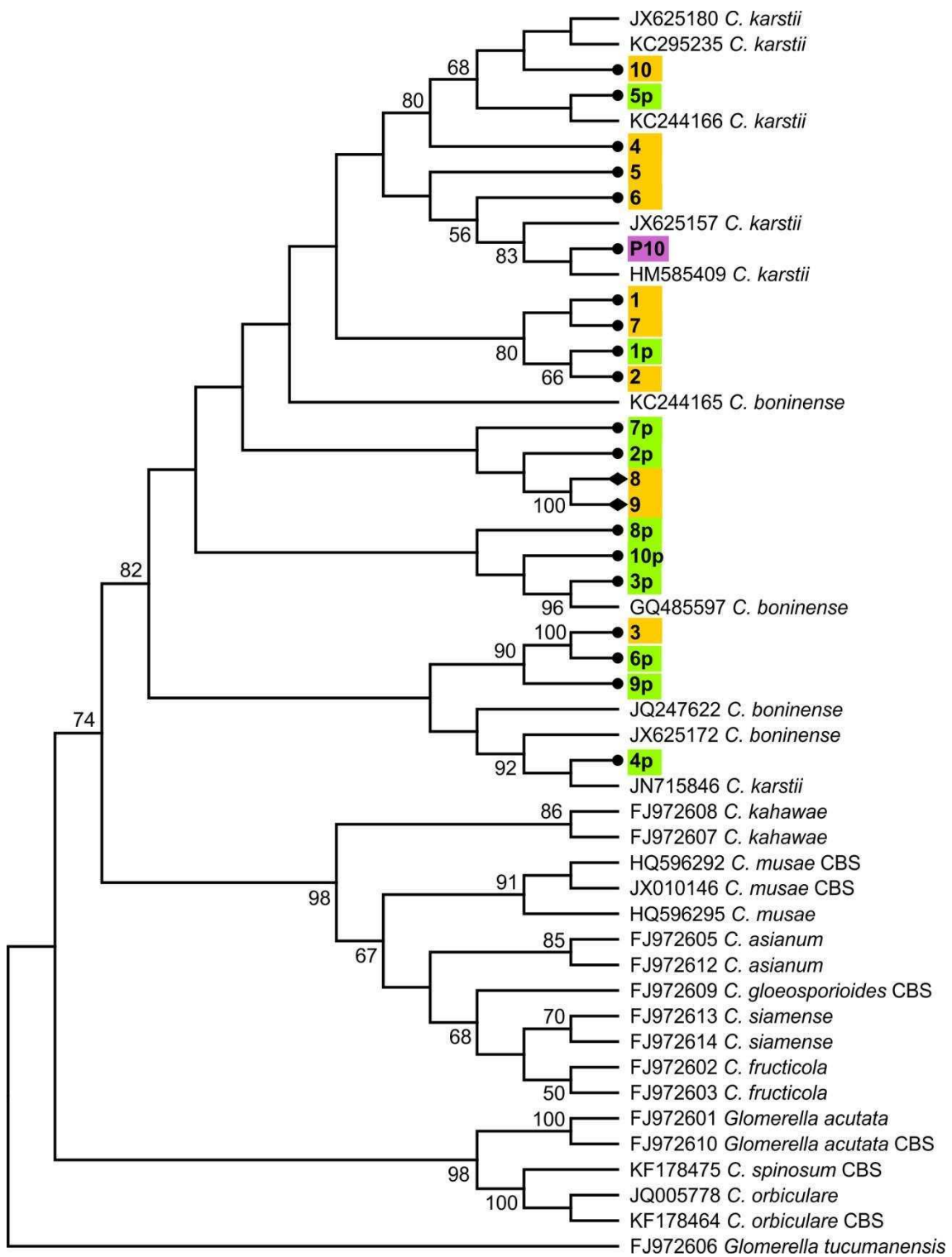


Fig. 3.9. Máxima verosimilitud. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones ITS a partir de 21 secuencias y según el modelo K2+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

## Región Actina

El análisis de máxima parsimonia dio como resultado 21 árboles filogenéticos ( $L = 330$ ;  $Ci = 0,712$ ;  $Ri = 0,895$ ). Se obtuvieron 181 caracteres informativos en las 51 secuencias incluidas en el análisis. Las secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas durante este trabajo se ubicaron en 3 clados, uno compuesto por las cepas 2, 7, 5p, 6, 3, 4, 1, 5, otro formado por las cepas 6p, 10 y P10 y el tercero por las cepas 2p, 3p, 4p, 7p, 8p, 9p, 10p y 1p con soportes de Bootstrap de 57%, 80% y 99% respectivamente. Los agrupamientos obtenidos muestran que las cepas argentinas correspondieron a *C. karstii* para los 2 primeros clados y *C. boninense* para el último clado (Fig. 3.10).

Al realizar el *análisis bajo inferencia bayesiana*, se realizaron 3 corridas con 6.000.000 generaciones, descartándose el 25% de los árboles. Las secuencias estudiadas correspondientes a las cepas recuperadas en este trabajo aparecen agrupadas de manera similar formándose los mismos clados que los vistos por parsimonia con las cepas 5, 10, 4, 7, 2, 1, 5p, 3, 6, 6p y P10 correspondiendo con *C. karstii* y las cepas 1p, 2p, 3p, 4p, 7p, 8p, 9p, y 10p correspondiendo con *C. boninense* (Fig. 3.11).

El análisis de máxima verosimilitud muestra que los mismos agrupamientos observados en los análisis de parsimonia e inferencia bayesiana la mayoría con soportes de 0,87 a 1 (Fig. 3.12). La cepa P19 no se agrupa con ninguna especie en particular quedando entre *C. acutata* y *C. siamense* en los 3 análisis, mientras que las cepas 8 y 9 aparecen separadas del gran clado correspondiente a *C. boninense* y *C. karstii* con soportes de 99%, 1 y 100% para parsimonia, inferencia bayesiana y Máxima verosimilitud respectivamente (Fig. 3.10-12).



Fig. 3.10. Árbol consenso obtenido a partir de secuencias del gen de la Actina, para la secuencias endofíticas obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia en MEGA 6. En las ramas se muestran los soportes de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

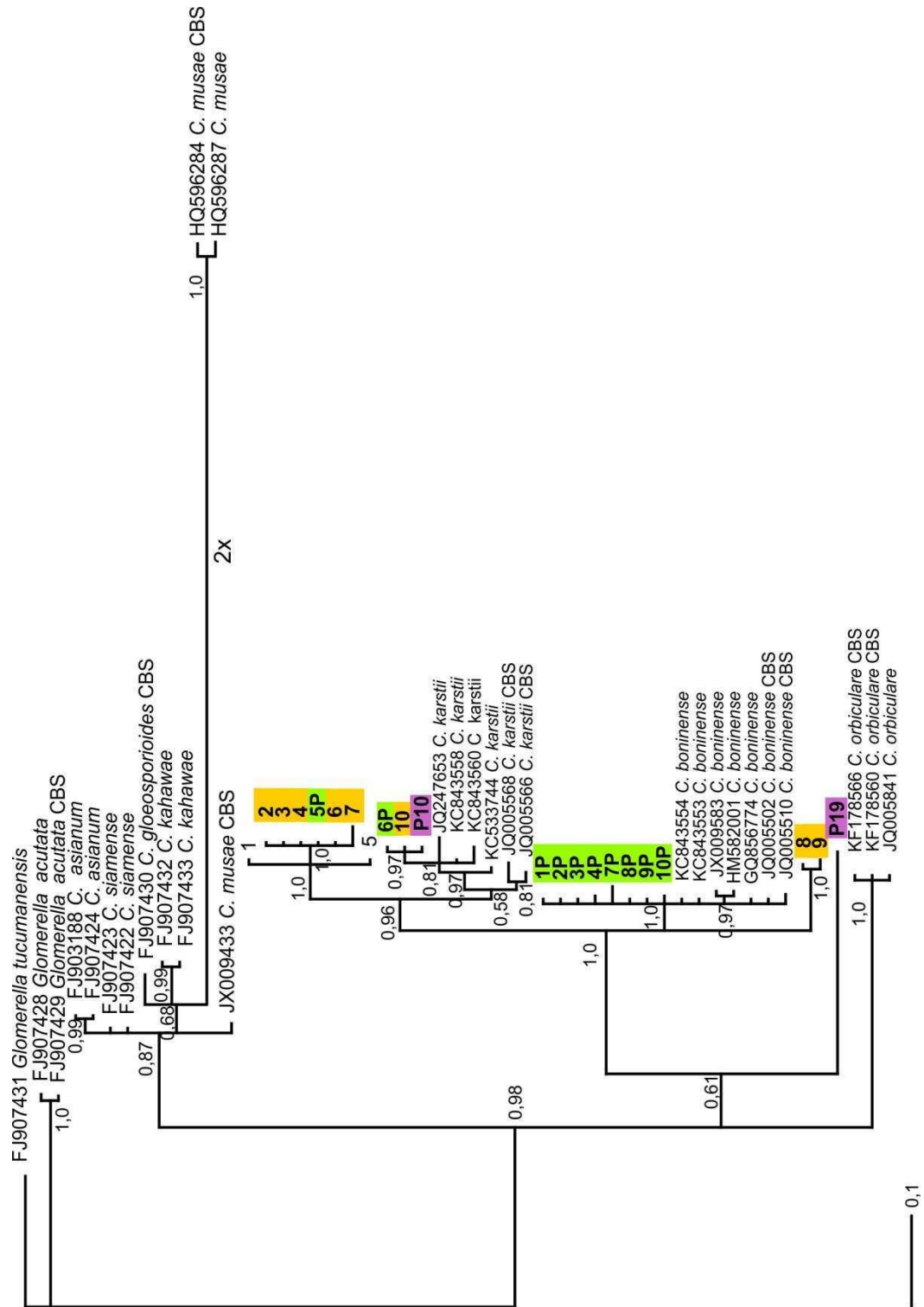
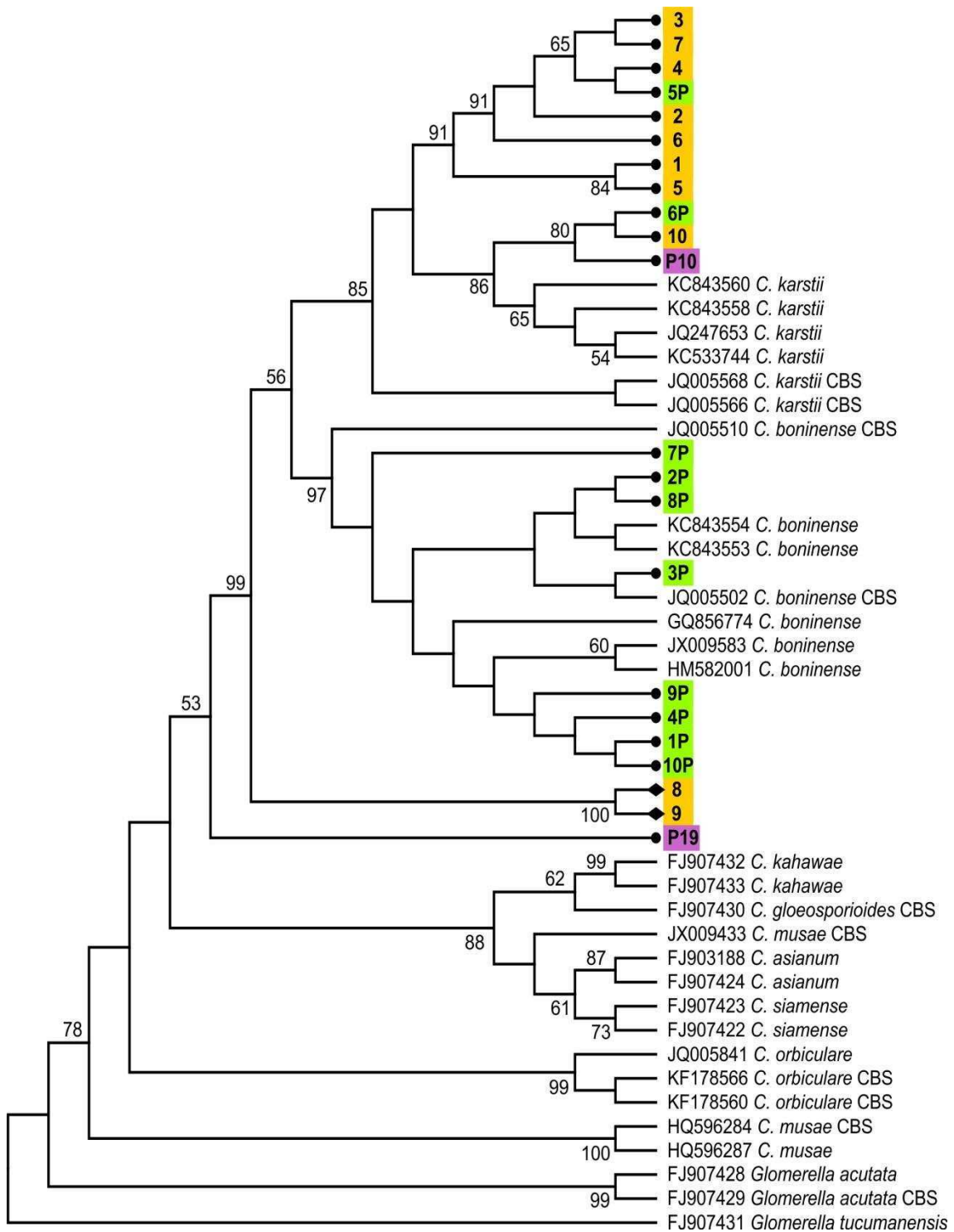


Fig. 3.11. Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones Actina a partir de 22 secuencias. Las probabilidades *a posteriori* se indican sobre las ramas en negrita y los valores mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.



**Fig. 3.12. Máxima verosimilitud. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones Actina a partir de 22 secuencias y según el modelo K2+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negra y los valores de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.**

## Región $\beta$ -Tubulina

El análisis mediante máxima parsimonia dio como resultado 158 árboles filogenéticos ( $L = 297$ ;  $Ci = 0,605$ ;  $Ri = 0,82$ ). Se obtuvieron 158 caracteres informativos en las 52 secuencias incluidas en el análisis. Las secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas durante este estudio se ubicaron en 2 clados, uno compuesto por las cepas 1, 6, 4, 7, 5, 2, 3, 10, 5p y 6p y el otro por las cepas 4p, 2p, 3p, 7p, 8p, 9p, 1p y 10p ambos con alto soporte de Bootstrap (92% y 96% respectivamente), estos agrupamientos obtenidos muestran que las cepas argentinas correspondieron a *C. karstii* y *C. boninense* respectivamente (Fig. 3.13).

Al realizar el *análisis bajo inferencia bayesiana*, se realizaron 3 corridas con 5.000.000 generaciones, descartándose luego el 25% de los árboles. Las secuencias recuperadas formaron 2 clados, uno conformado por las cepas 1, 2, 3, 10, 4, 5, 7, 5p, 6, 6p, y P10 (0,97) y un segundo clado formado por las cepas 1p, 7p, 2p, 3p, 8p, 9p, 10p y 4p (0,87) que aparecen con las especies *C. karstii* y *C. boninense* respectivamente (Fig. 3.13). Estos clados formados son los mismos que los vistos por el análisis de parsimonia, pero con ligeras diferencia en las agrupaciones (Fig. 3.14). El análisis de máxima verosimilitud reveló los mismos agrupamientos anteriores con un soporte de 84% y 96% respectivamente para los clados mencionados (Fig. 3.15).

Cabe recalcar que la cepa P19 para este gen, se agrupa con la especie *C. euphorbiae* en los 3 análisis con un soporte de 99%, 0,98 y 100% para parsimonia, inferencia bayesiana y máxima verosimilitud respectivamente. Las cepas 8 y 9 aparecen separadas del gran clado correspondiente a *C. boninense* y *C. karstii* con soportes de 98%, 0,97 y 94% para parsimonia, inferencia bayesiana y Máxima verosimilitud respectivamente (Fig. 3.13-15).

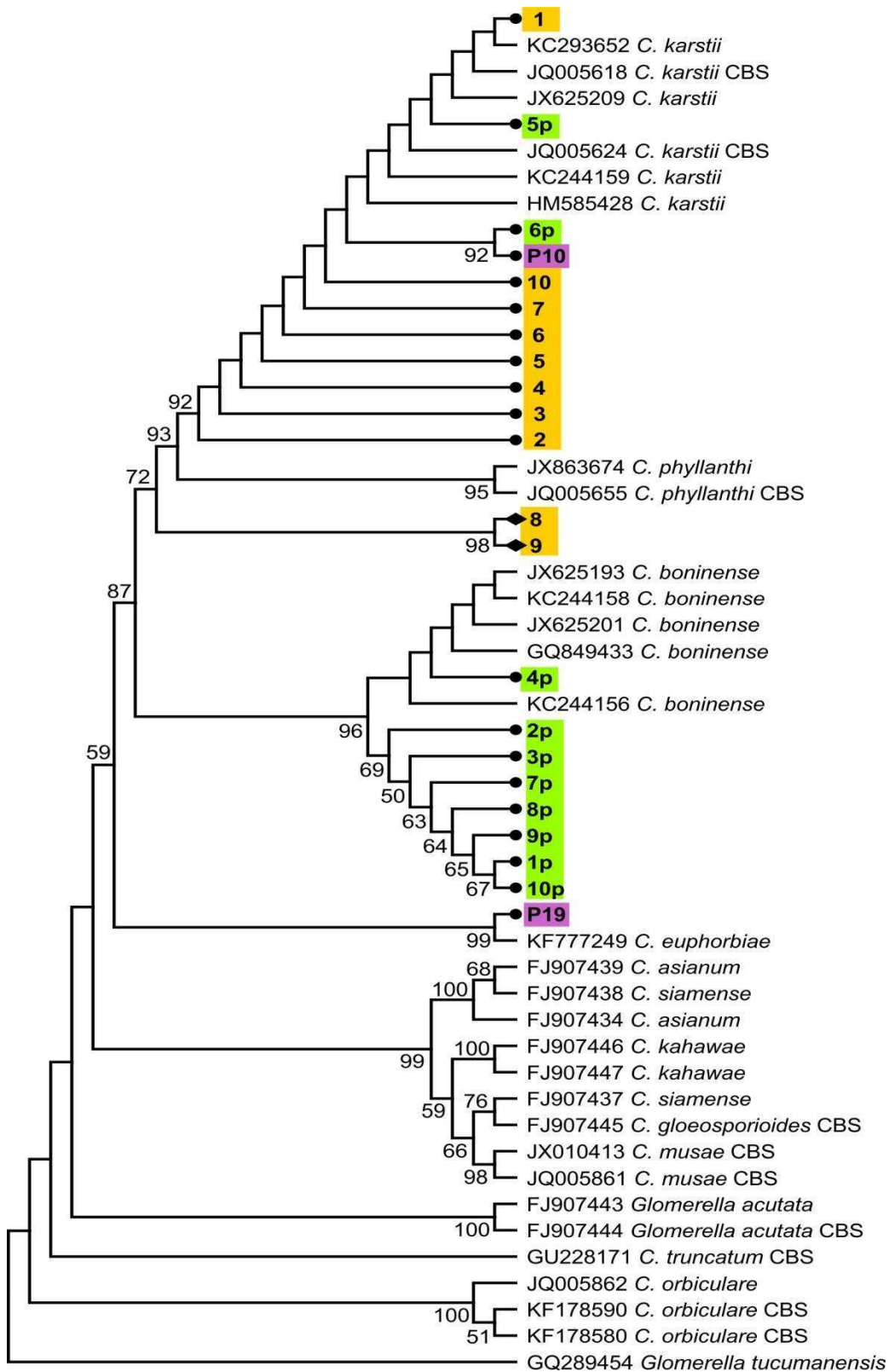


Fig. 3.13. Árbol consenso obtenido a partir de secuencias del gen de la  $\beta$ -Tubulina, para la secuencias endofíticas obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia en MEGA 6. En las ramas se muestran los soportes de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.



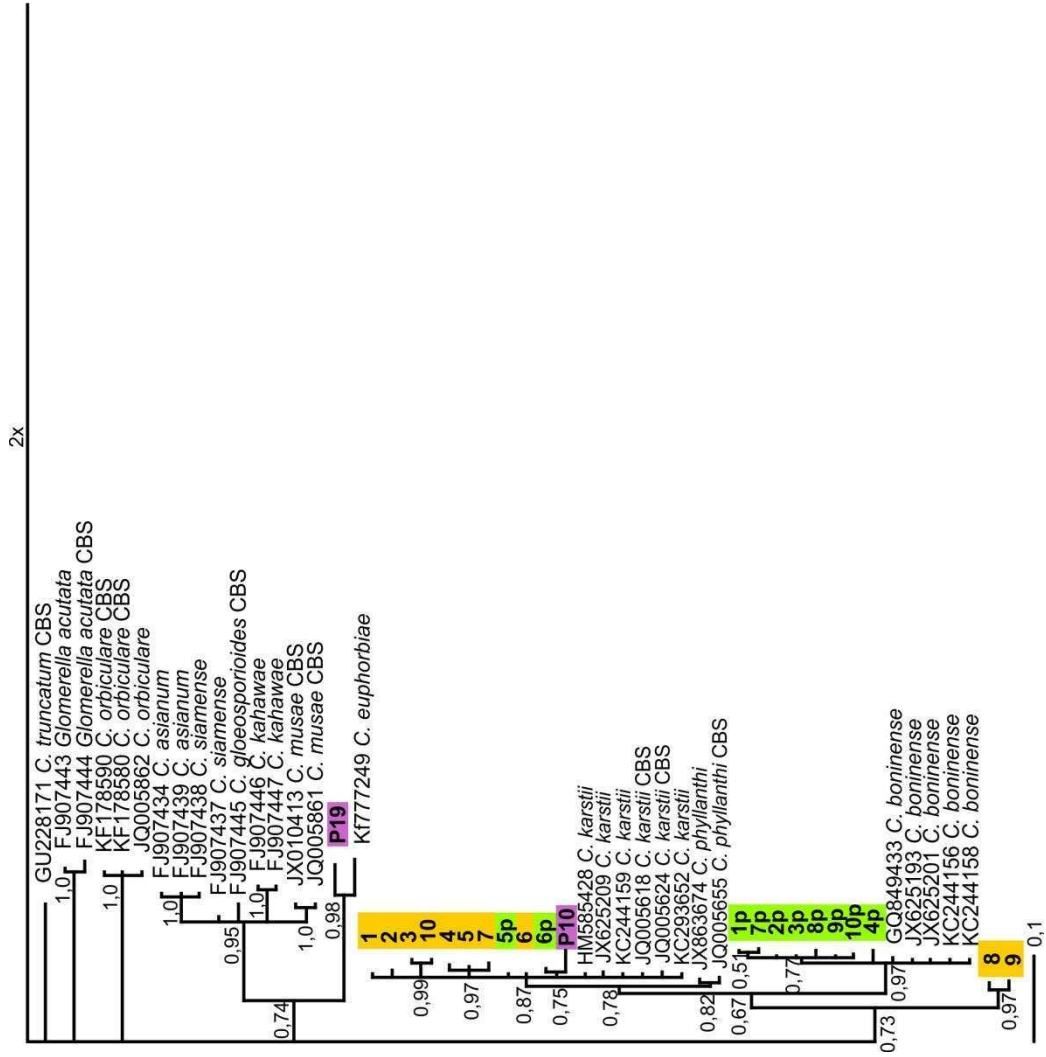
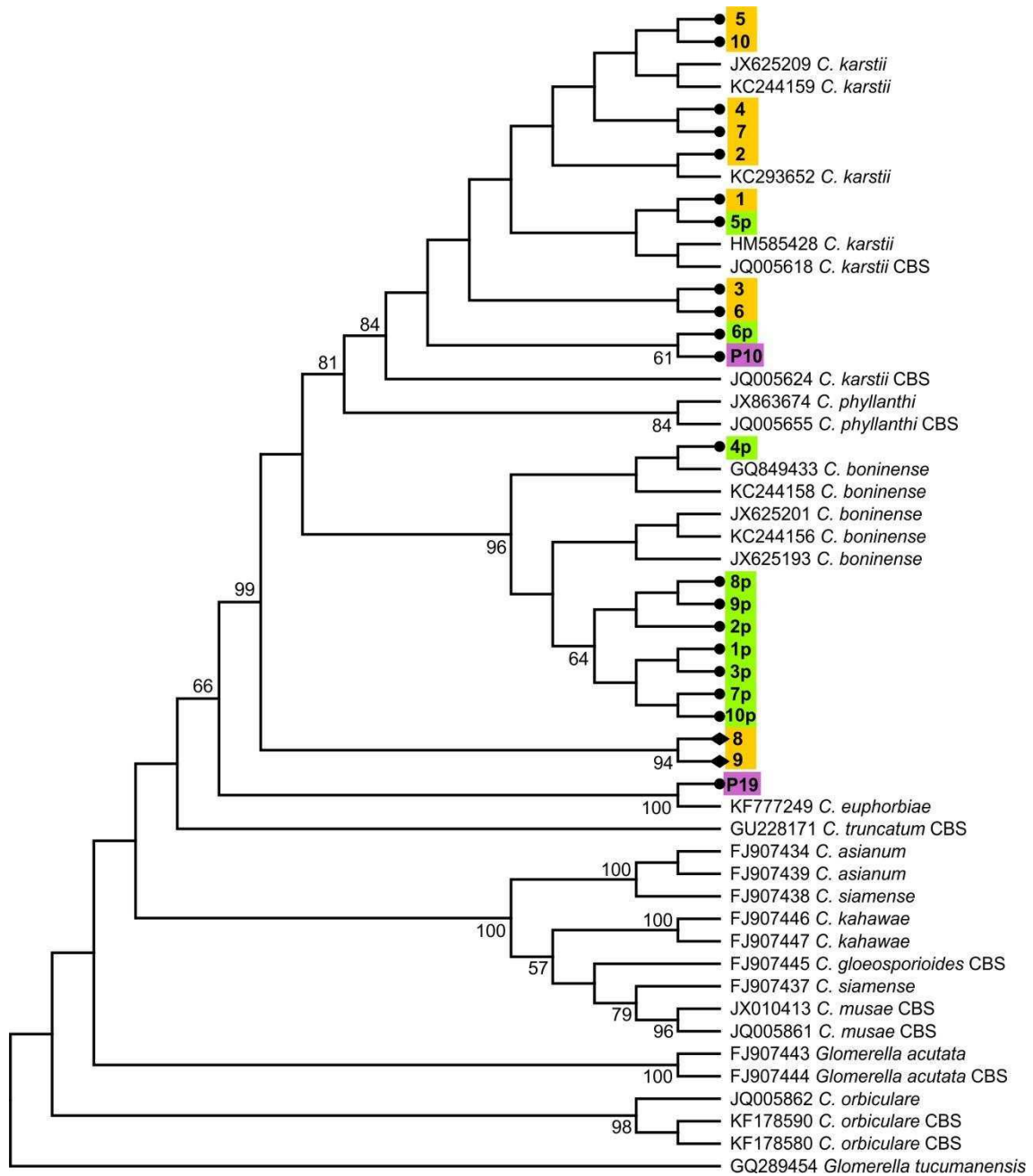


Fig. 3.14. Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones  $\beta$ -Tubulina a partir de 22 secuencias. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y los valores de mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

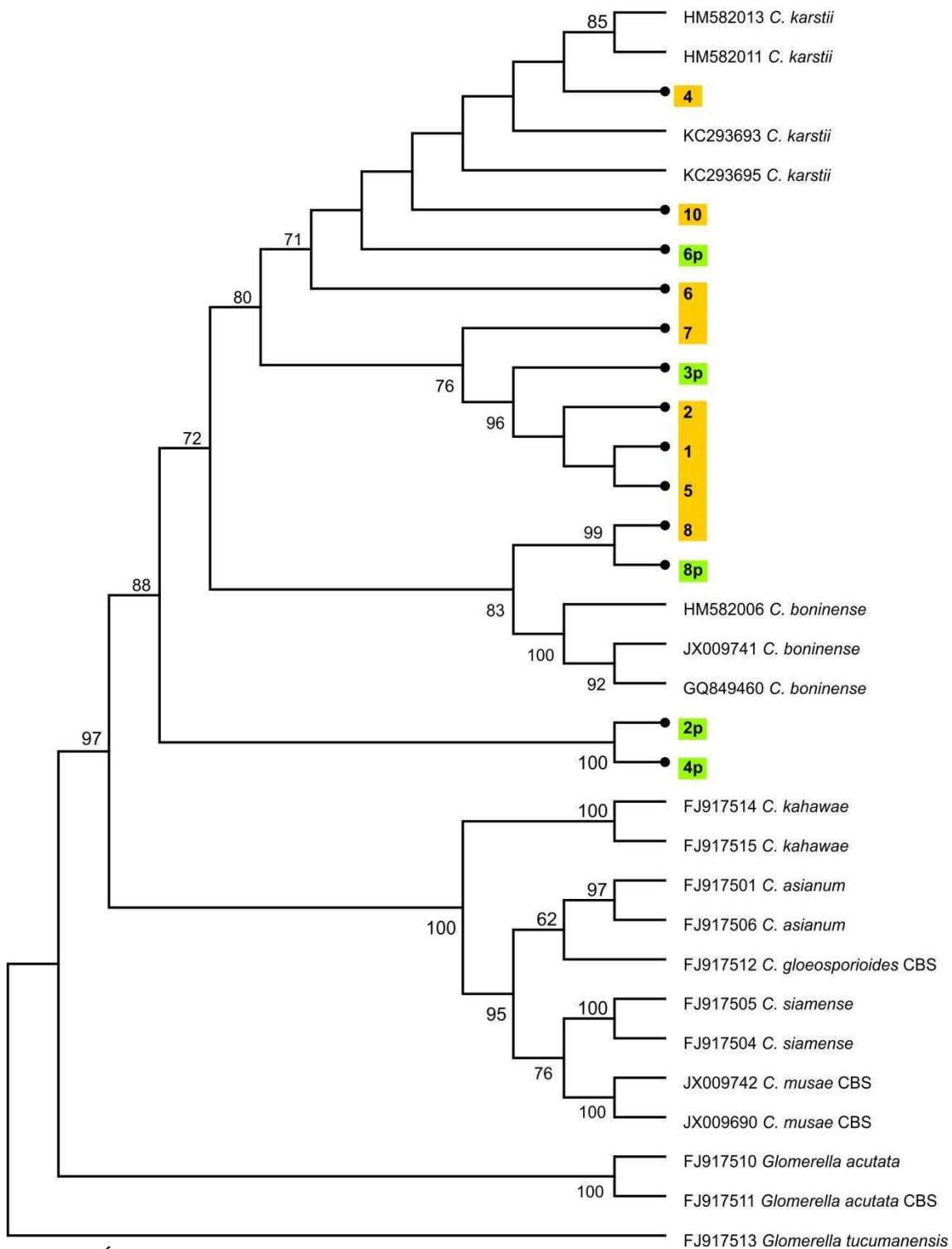


**Fig. 3.15. Máxima verosimilitud. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en el gen de  $\beta$ -Tubulina a partir de 22 secuencias y según el modelo K2+G+I. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.**

## Región Calmodulina

El análisis mediante máxima parsimonia dio como resultado 48 árboles filogenéticos ( $L = 714$ ;  $Ci = 0,794$ ;  $Ri = 0,893$ ). Se obtuvieron 395 caracteres informativos en las 32 secuencias incluidas en el análisis. Las secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas durante este trabajo se ubicaron en 3 clados, uno compuesto por las cepas 4, 10, 6p, 6, 7, 3p, 2, 1, 5; otro por las cepas 8 y 8p; y un tercero por las cepas 2p y 4p todos con alto soporte de Bootstrap 80%, 83% y 100% respectivamente. Los agrupamientos obtenidos muestran que las cepas argentinas corresponden a *C. karstii* y *C. boninense* para los primeros 2 clados y el tercer clado queda por fuera del clado conformado de las especies antes mencionadas (Fig. 3.16).

Al realizar el análisis bajo *inferencia bayesiana*, se realizaron 3 corridas con 5.000.000 generaciones, descartando el 25% de los árboles. Las secuencias recuperadas correspondientes a las cepas estudiadas en este trabajo formaron un único clado asociado con la especie *C. karstii* con soporte de 0,99 y quedando como grupo hermano *C. boninense* (Fig. 3.17). El análisis de máxima verosimilitud reveló una formación de clado igual al obtenido por parsimonia, pero con un soporte de 94% para el clado de *C. karstii*, 91% para el clado de *C. boninense* y 100% para el clado con las cepas 2p y 4p (Fig. 3.18). El gen de Calmodulina presentó varios problemas al momento de la amplificación, solo pudiéndose amplificar de las 13 de las 22 cepas utilizados en los otros genes y ninguna correspondiente al sitio adicional (Fig. 3.16-18).



**Fig. 3.16.** Árbol consenso obtenido a partir de secuencias del gen de la Calmodulina, para la secuencias endofíticas obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia en MEGA 6. En las ramas se muestran los soportes de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

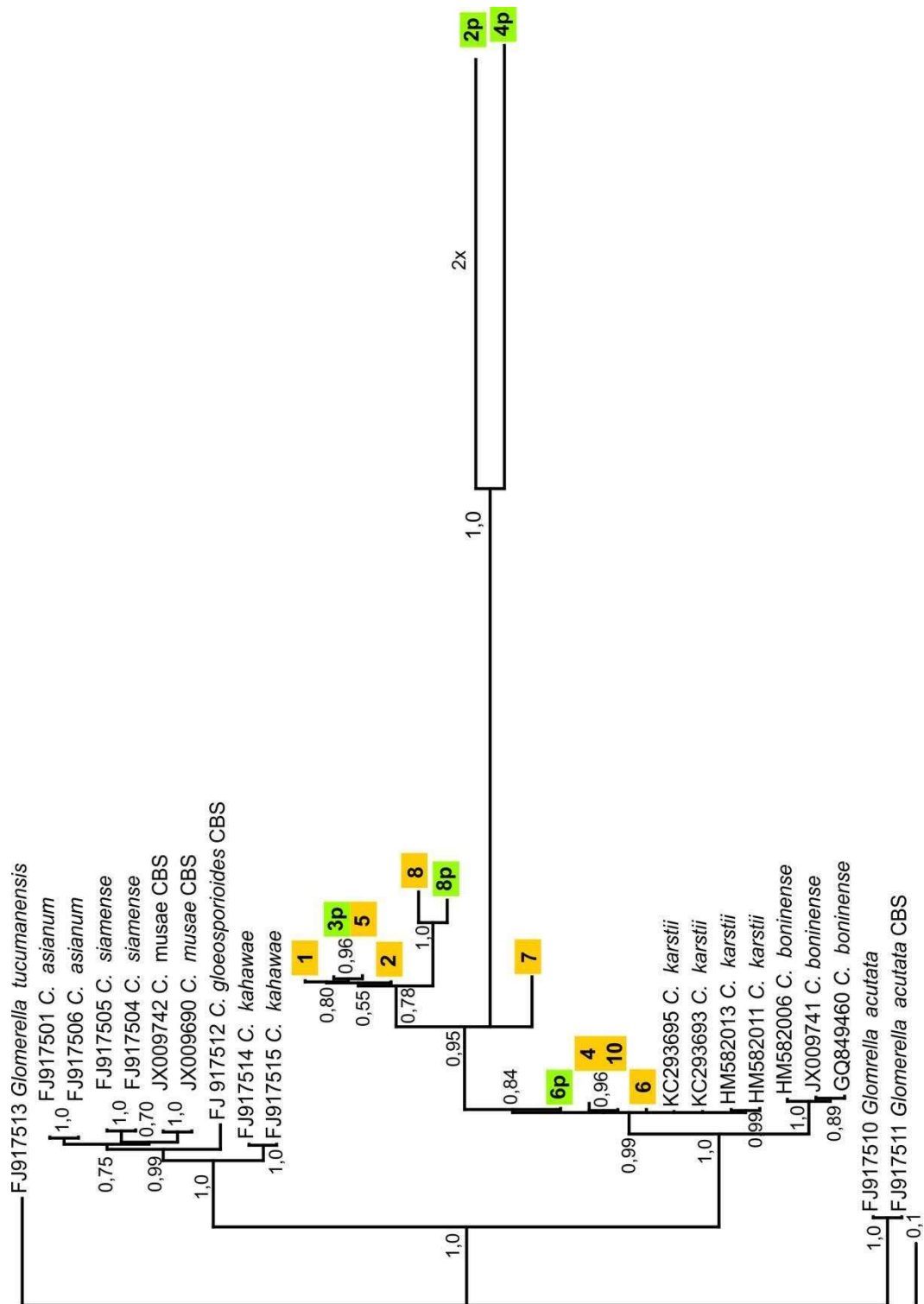
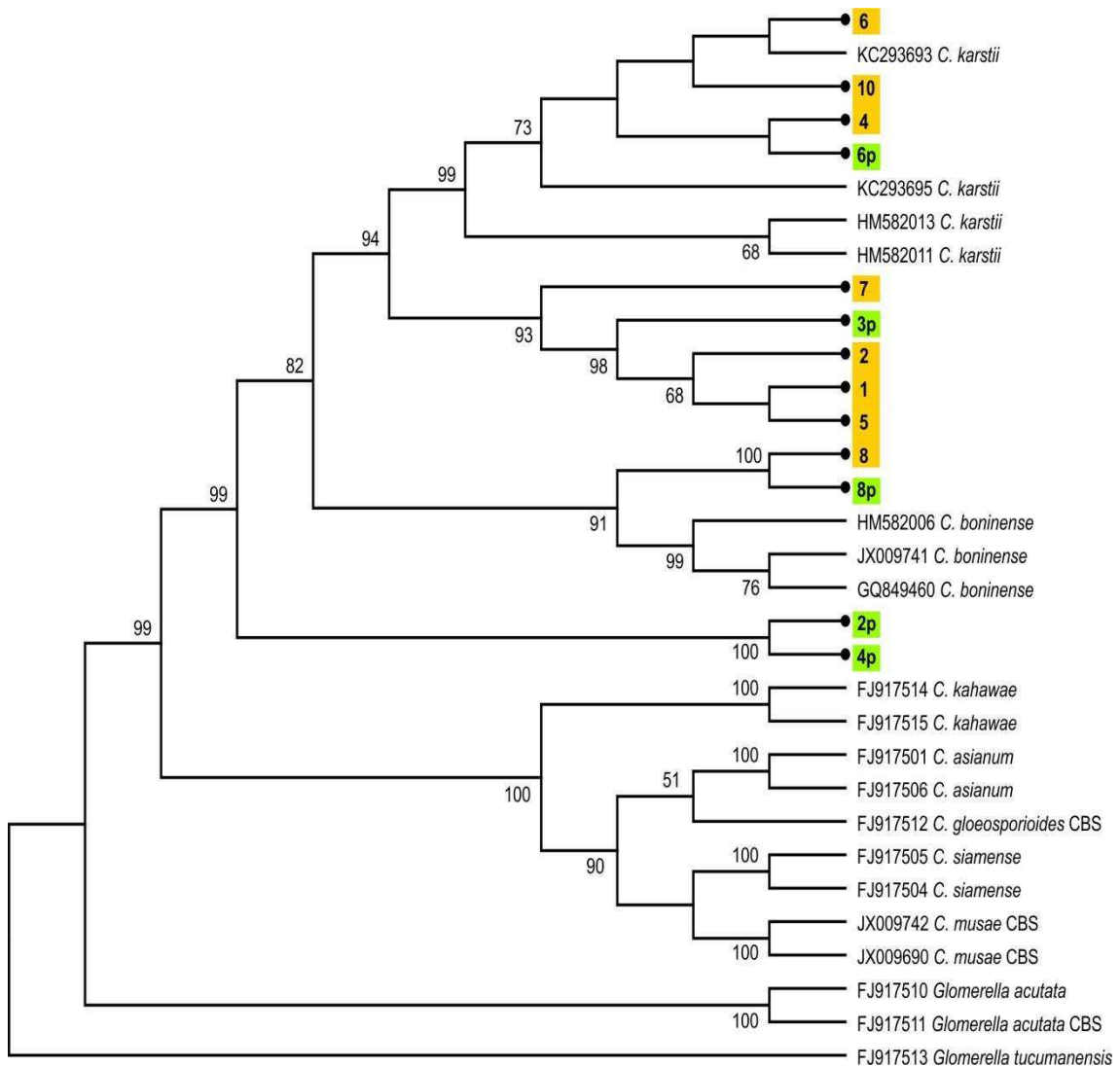


Fig. 3.17. Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones Calmodulina a partir de 13 secuencias. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y valores mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.



**Fig. 3.18. Máxima verosimilitud. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones Calmodulina a partir de 13 secuencias y según el modelo K2+G. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.**

### **Región Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa**

El análisis mediante máxima parsimonia dio como resultado x árboles filogenéticos ( $L = 365$ ;  $Ci = 0,614$ ;  $Ri = 0,869$ ). Se obtuvieron 197 caracteres informativos en las 53 secuencias incluidas en el análisis. Las secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas durante este trabajo se agruparon en 2 clados, uno compuesto por las cepas 10, P10, 5p, 1, 6p 7, 5, 4, 3, 2, y 6; y otro clado formado por las cepas 1p, 2p, 3p, 4p, 7p, 8p, 9p, y 10p ambos con un alto soporte de Bootstrap (99 %). Los agrupamientos obtenidos muestran que las cepas argentinas corresponden a *C. karstii* y *C. boninense* respectivamente (Fig. 3.19).

Al realizar el análisis bajo *inferencia bayesiana*, se realizaron 3 corridas con 5.000.000 generaciones, descartando el 25% de los árboles. Las secuencias estudiadas correspondiente a las cepas recuperadas en este trabajo aparecen formaron 2 clados semejantes a lo visto para el análisis de parsimonia, estos 2 clados correspondieron a las especies *C. karstii* y *C. boninense* respectivamente (Fig. 3.20). El análisis de máxima verosimilitud mostró que se formaron 3 clados, uno conformado por las cepas 10, P10, 1, 4, 3, 7, 2, 5, 5p, 6p, asociado a la especie *C. karstii*, otro formado por las cepas 4p, 8p, 2p, 1p, 3p, 9p, 7p, y 10p asociado a la especie *C. boninense* y la cepa 6 quedando por fuera de los 2 clados anteriores. Las cepas 8 y 9 aparecen separadas del gran clado correspondiente a *C. boninense* y *C. karstii* con soportes de 95%, y 0,81 % para parsimonia e inferencia bayesiana respectivamente, para máxima verosimilitud el análisis no dio un soporte mayor al 50% (Fig. 3.21). Se recalca que la cepa P19 para este gen, se agrupa con la especie *C. euphorbiae* en los 3 análisis con un soporte de 89%, 0,66 y 92% para parsimonia, inferencia bayesiana y máxima verosimilitud respectivamente (Fig. 3.19-21).

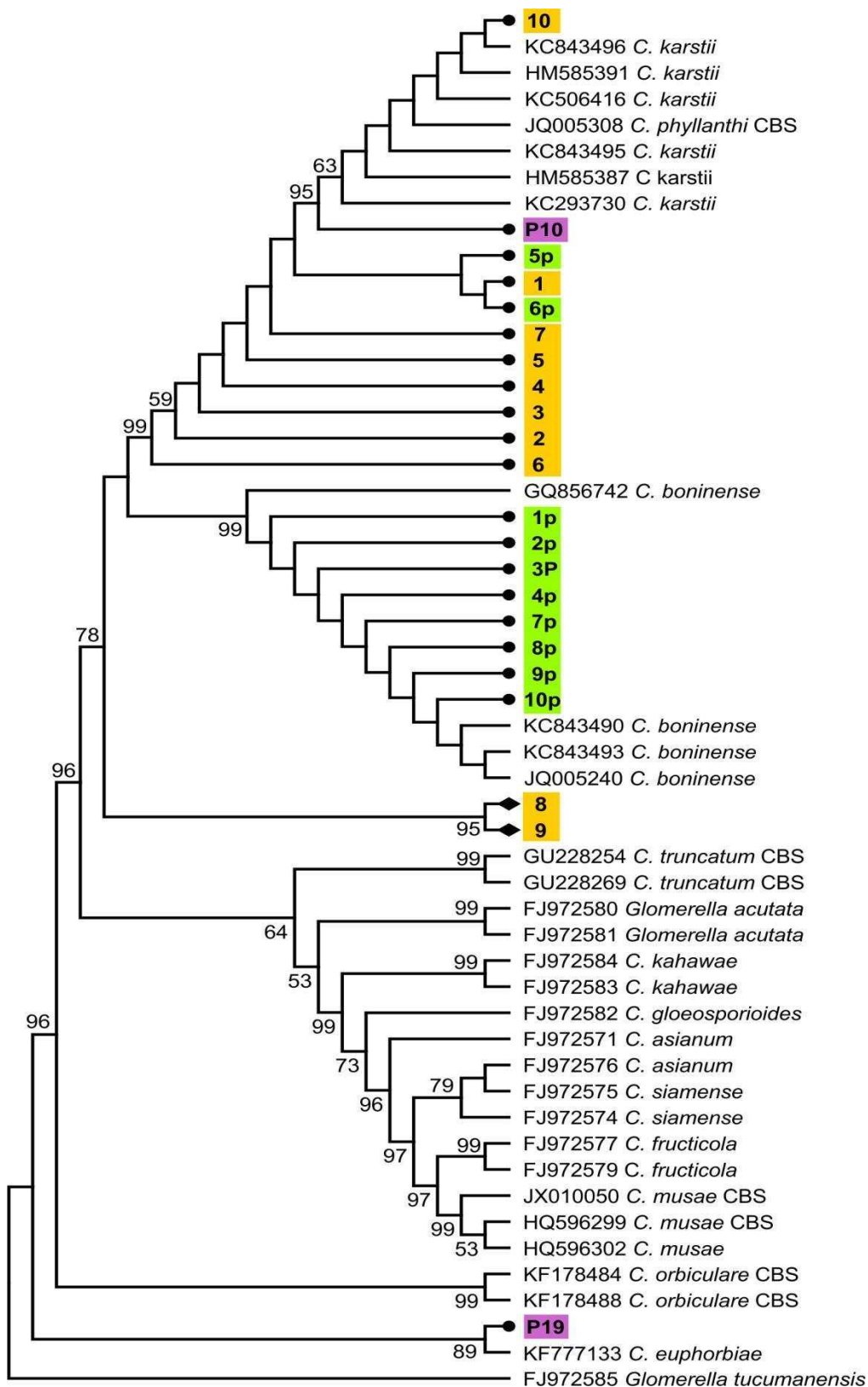


Fig. 3.19. Árbol consenso obtenido a partir de secuencias del gen de la GDPH, para la secuencias endofíticas obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia en MEGA 6. En las ramas se muestran los soportes de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.



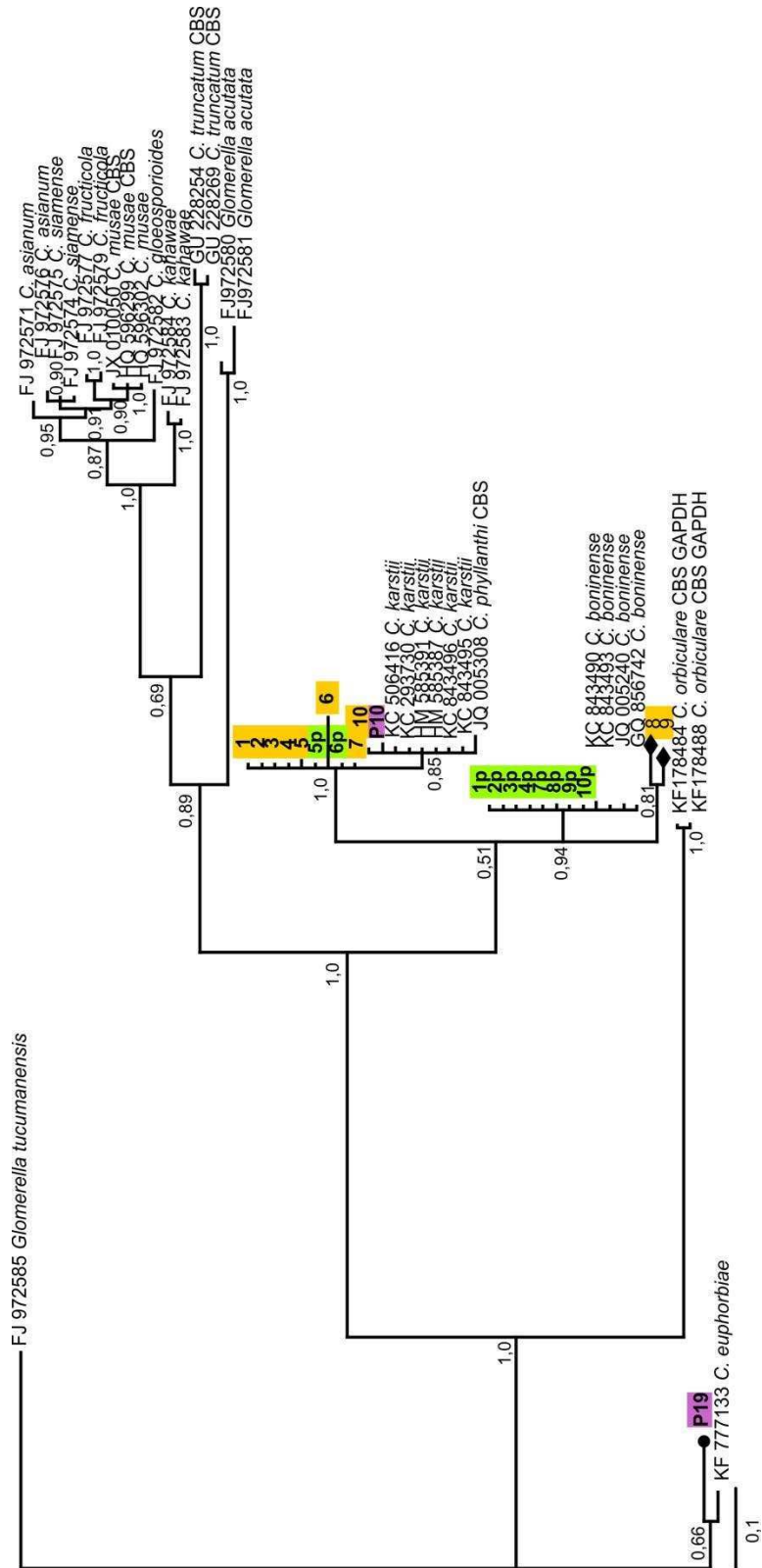


Fig. 3.20. Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones GDPH a partir de 22 secuencias. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y valores mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

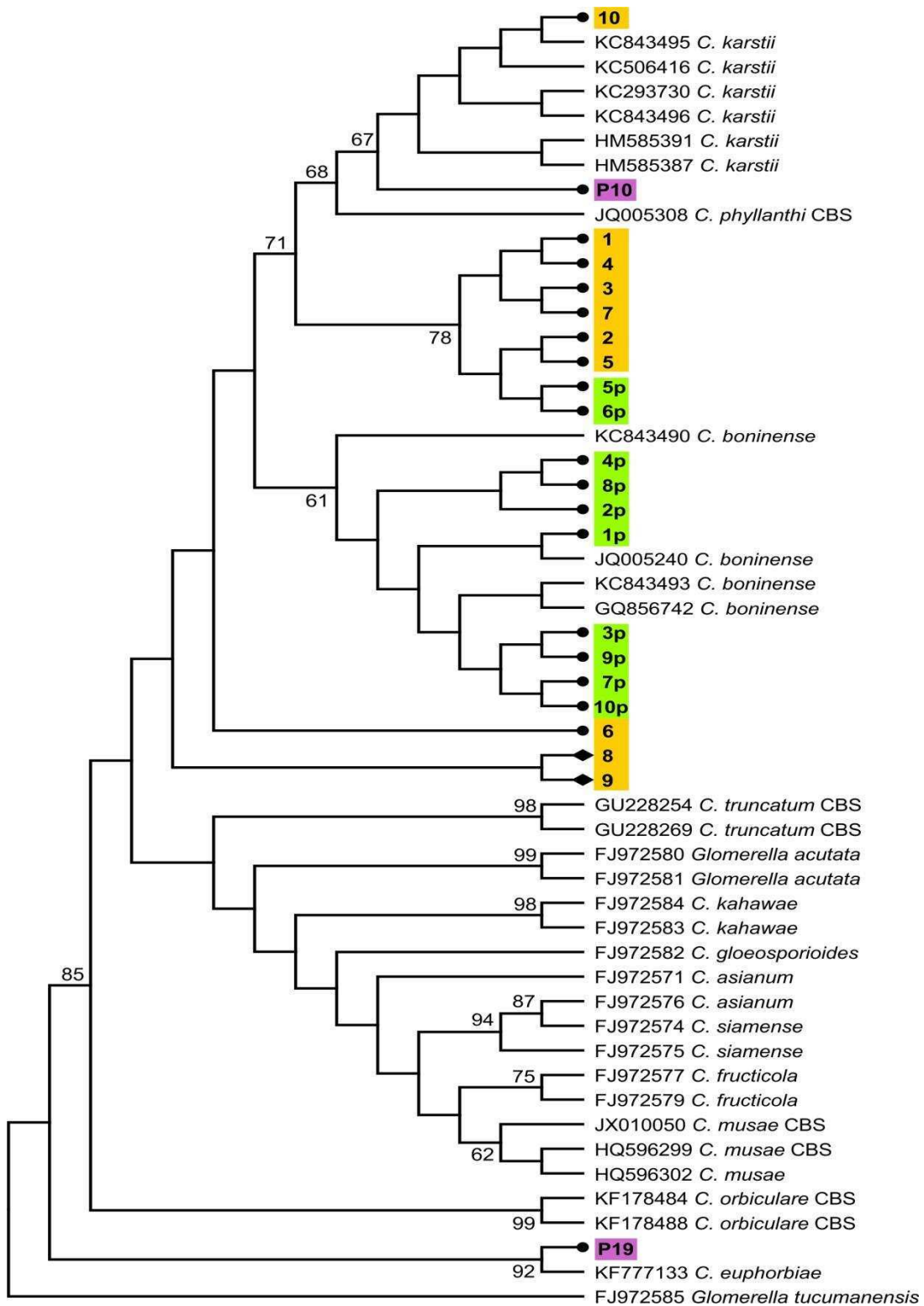


Fig. 3.21. Máxima verosimilitud. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones GDPH a partir de 22 secuencias y según el modelo HKY+G+I. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en **negrita** y los valores de Bootstrap mayores a 50% se indican en *itálica*. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

## Región Glutamina Sintetasa

El análisis mediante máxima parsimonia dio como resultado x árboles filogenéticos ( $L = 1379$ ;  $Ci = 0,63$ ;  $Ri = 0,847$ ). Se obtuvieron 720 caracteres informativos en las 48 secuencias incluidas en el análisis. Las secuencias pertenecientes a las cepas obtenidas durante este trabajo se agruparon en 2 clados, uno compuesto por las cepas 5p, 7, 6, 1, 5, 4, 3, 2, 10, 6p, y P10 y el otro formado por las cepas 4p, 2p, 8p, 3p, 1p, 10p, 7p, y 9p, ambos clados con un alto soporte de Bootstrap (99 % en ambos casos). Los agrupamientos obtenidos muestran que las cepas argentinas corresponden a *C. karstii* para el primer clado y *C. boninense* para el segundo (Fig. 3.22).

Al realizar el *análisis bajo inferencia bayesiana*, se realizaron 3 corridas con 8.000.000 generaciones, descartando luego el 25% de los árboles. Las secuencias estudiadas correspondientes a las cepas recuperadas en este trabajo aparecen formaron 2 clados, uno conformado por las cepas 1, 2, 6, 3, 5p, 4, 5, 7, 6p, 10, y P10 asociado a la especie *C. karstii* y otro con las cepas 1p, 10p, 7p, 9p, 3p, 8p, 2p, y 4p correspondiente con la especie *C. boninense* ambos con un soporte de 1 (Fig. 3.23). El análisis de máxima verosimilitud revela un agrupamiento igual (2 clados) al observado en parsimonia con un soporte de 96% y 100% respectivamente para los clados correspondientes a *C. karstii* y *C. boninense* (Fig. 3.24).

Cabe recalcar que la cepa P19 para este gen no se agrupa con la especie *C. euphorbiae* en ninguno de los 3 análisis realizados y tampoco se agrupa con *C. karstii*, especie con la cual tuvo altos valores de Query coverage e Identidad en el análisis por Blast. Por otro lado esta cepa se agrupa en un clado con las especies *C. orbiculare* y *C. spinosum* con un soporte de 1 y 63% para inferencia bayesiana y máxima verosimilitud

respectivamente, mientras que en el análisis de parsimonia queda fuera del gran clado formado por *C. karstii* y *C. boninense*. Las cepas 8 y 9 nuevamente aparecen separadas del gran clado correspondiente a *C. boninense* y *C. karstii* con soportes de 100%, 1 y 100% para parsimonia, inferencia bayesiana y Máxima verosimilitud respectivamente (Fig. 3.22-24). En la tabla 3.x se resume los genes donde las cepas 8 y 9 presentaron alto soporte, cabe recordar que para el gen de Calmodulina solo se pudieron obtener amplificación para 13 de las 22 muestras (Tabla 3.13).

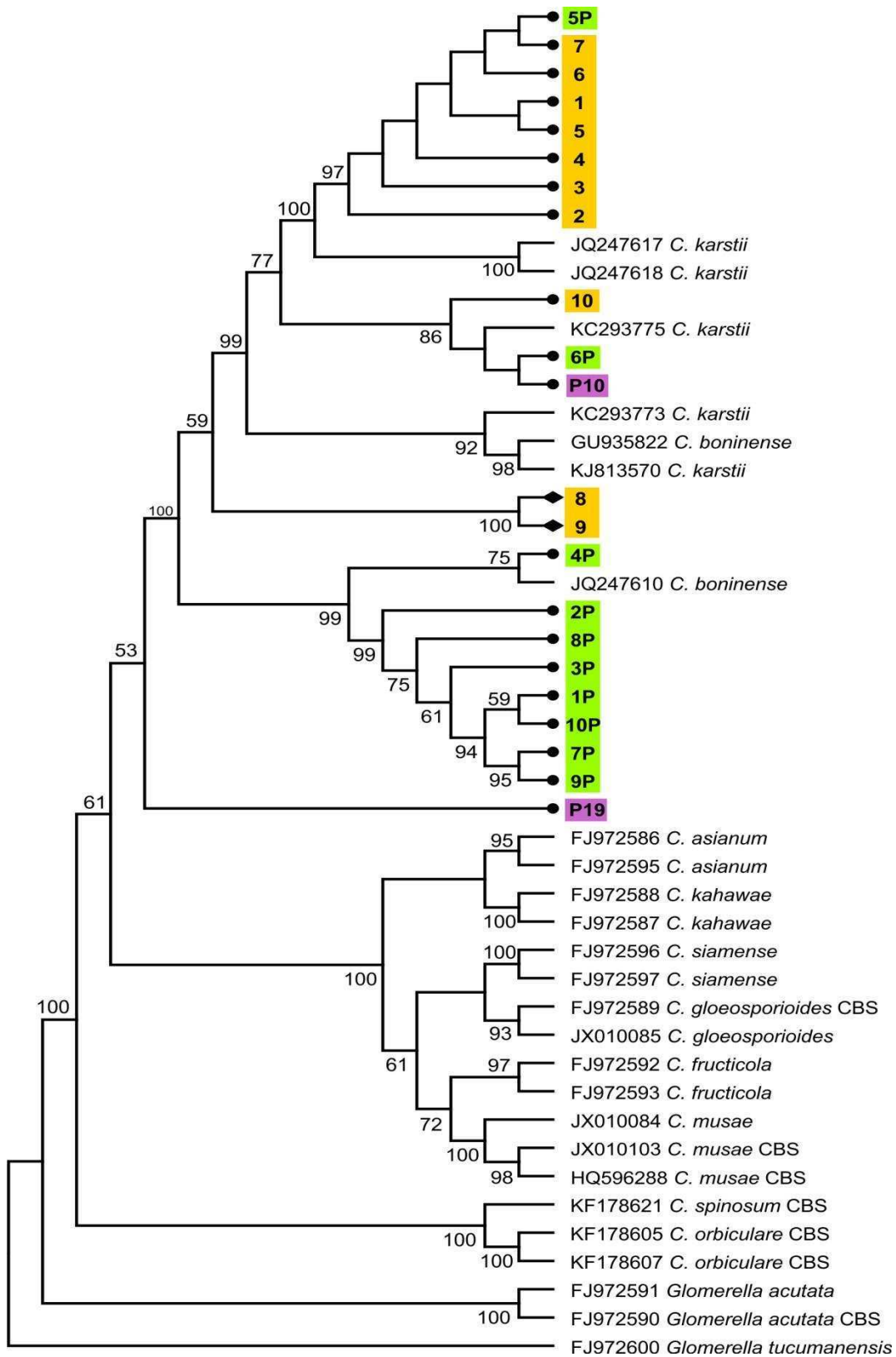
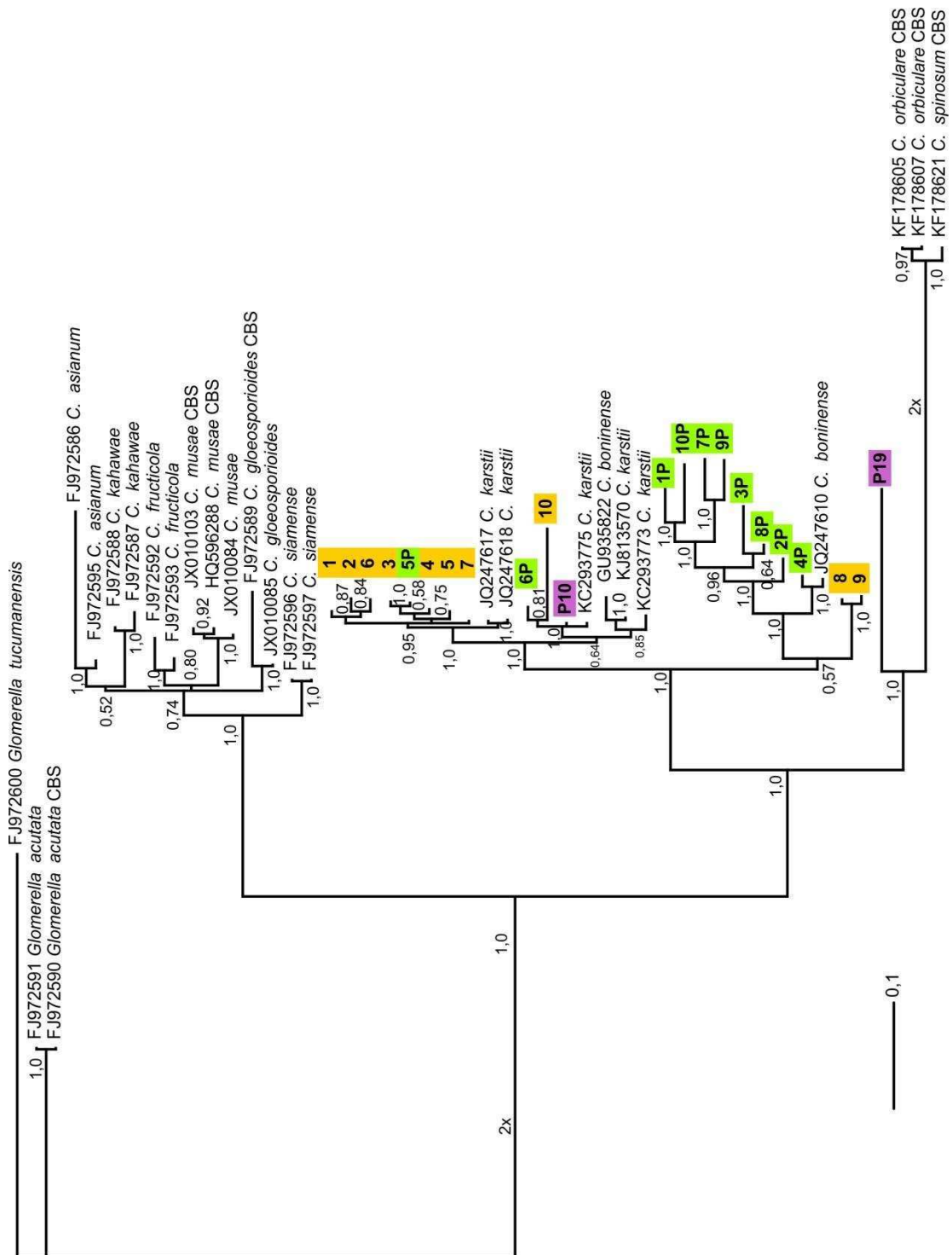


Fig. 3.22. Árbol más parsimonioso obtenido a partir de secuencias del gen GS, para la secuencias endofíticas obtenidas, bajo análisis de máxima parsimonia en MEGA 6. En las ramas se muestran los soportes de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.



**Fig. 3.23.** Inferencia bayesiana. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones GS a partir de 22 secuencias. Las probabilidades *a posteriori* se indican en las ramas en negrita y valores mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

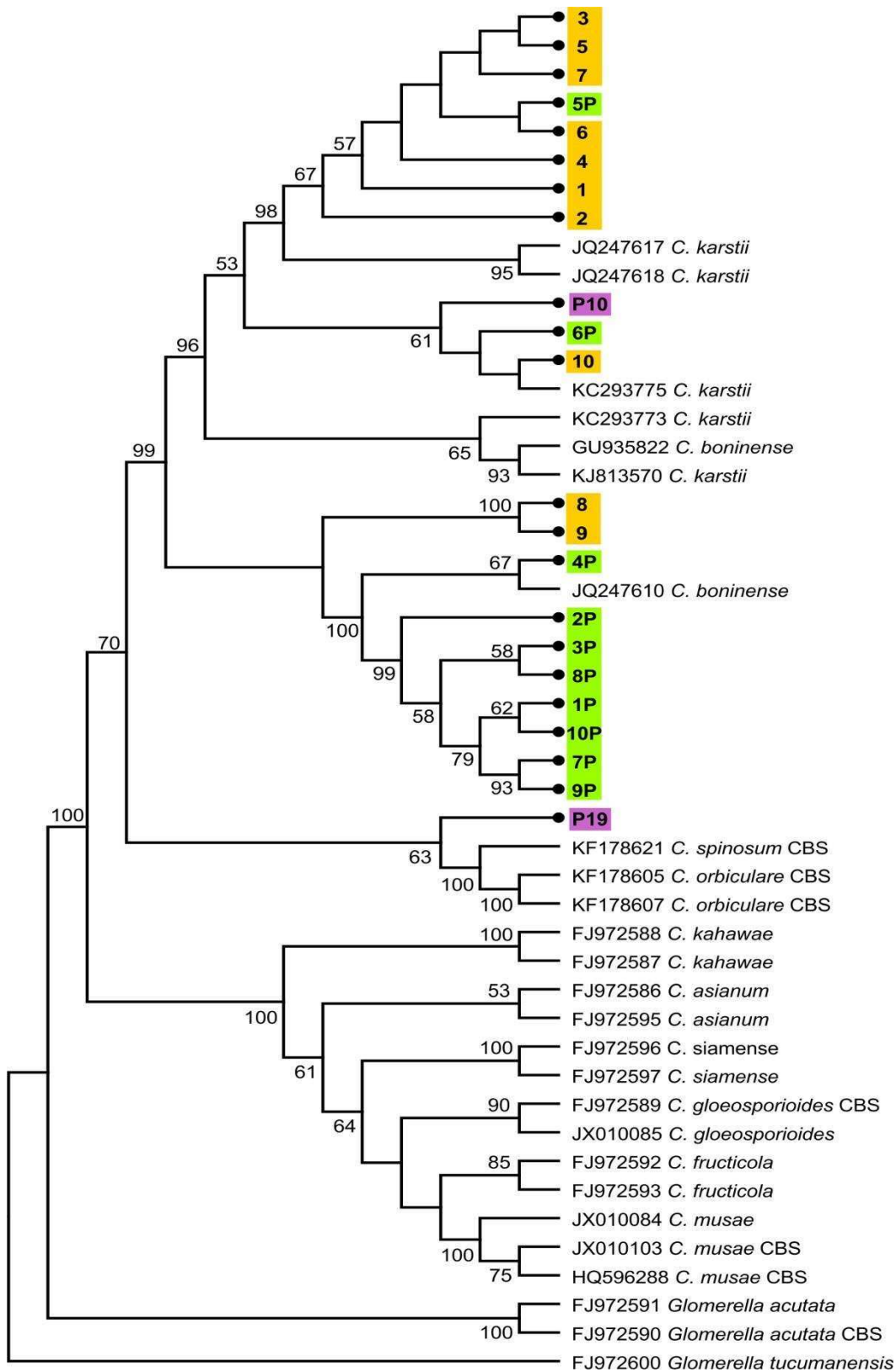


Fig. 3.24. Máxima verosimilitud. Árbol consenso de mayoría (50%) de especies endofíticas basadas en las regiones GS a partir de 22 secuencias y según el modelo T92+G. Las probabilidades a posteriori se indican en las ramas en negrita y los valores de Bootstrap mayores a 50%. Los colores representan las áreas estudiadas según la tabla 3.1.

Las cepas 8 y 9 correspondientes aisladas del sitio 2 se agruparon juntas, pero se mantuvieron separadas de los grupos correspondientes a las cepas de referencia de las especies *C. Karstii* y *C. boninense*, en la tabla 3.13 se muestran los genes en los que estas cepas aparecieron juntas y en todos los casos con alto soporte entre sí.

**Tabla 3.13. Se muestra los análisis filogenéticos donde las cepas 8 y 9 obtuvieron un alto soporte para cada tipo de análisis.**

Genes	Análisis filogenético: cepas 8 y 9		
	Parsimonia	Inferencia Bayesiana	Máxima verosimilitud
ITS	+	+	+
Actina	+	+	+
$\beta$ -Tubulina	+	+	+
Calmodulina	-	-	-
GDPH	+	+	+
GS	+	+	+



## Discusión

El género *Colletotrichum* fue erigido por Corda en 1831, y comprende a una gran grupo de ascomicetes con teleomorfos asignados al género *Glomerella* Spauld. & H. Schrenk 1903. Actualmente incluye a un gran número de especies, más de 100, con un adicional de 20 nombres recientemente considerados como dudosos (Cannon et al. 2012).

Varias especies de *Colletotrichum* han sido aisladas como endofitos, entre ellas *C. acutatum*, *C. aotearoa*, *C. boninense*, *C. fioriniae*, *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. ignotum*, *C. kahawae*, *C. karstii*, *C. musae*, *C. orchidophilum*, *C. theobromicola*, *C. tropicale* y *C. truncatum* (Lu et al. 2004; Photita et al. 2005; Huang et al. 2013; Weir et al. 2012). Incluso como endofitos de especies arbóreas (Prihastuti et al. 2009; Vieira et al. 2014).

Actualmente *Colletotrichum gloeosporioides* es considerado un complejo de especies, donde recientemente se han reconocido especies como *C. acutata*, *C. boninense* y *C. orbiculare* (Weir et al. 2012). Dos especies derivadas del complejo *C. gloeosporioides* y previamente descritas se han registrado en este estudio como *Colletotrichum boninense* y *Colletotrichum karstii* (ver consideraciones taxonómicas y figuras 3.16-24). Estas son especies relacionadas entre sí, ambas incluidas dentro del complejo *C. boninense*. Durante este trabajo todas las cepas identificadas como pertenecientes a *Colletotrichum*, podrían estar micro morfológicamente dentro del concepto asociado a *Colletotrichum gloeosporioides* debido a la gran superposición de caracteres morfológicos que existen en este taxón (Moriwaki et al. 2003), sin embargo los análisis

sobre la base de caracteres moleculares permitieron el reconocimiento de *C. boninense* y *C. karstii*. Actualmente *C. boninense* es un complejo de especies (*C. boninense* complex) que alberga alrededor de 17 especies reconocidas en el cual se incluye a *C. karstii* (Cannon et al. 2012) y su distinción de *C. gloeosporioides* es dificultosa solo sobre la base de caracteres morfológicos. Ambas especies *C. karstii* y *C. boninense* fueron previamente registradas como endofitos por Lu et al. (2004) trabajando en cultivos de *Citrus* en China y por Huang et al. (2013) en una reserva en Guyana sobre distintas plantas. El presente registro constituye el primer reporte de estas especies para *B. salicifolius* y para Argentina.

Las herramientas moleculares han sido utilizadas para identificar todo tipo de especies fúngicas. La región ITS (internal transcribed spacer) ha sido propuesta como la región génica para realizar barcoding en varios grupos fúngicos, sin embargo, aunque la región ITS es útil a nivel de grandes grupos de especies, el uso de esta región durante el presente trabajo ha corroborado su bajo poder de resolución respecto de las especies argentinas estudiadas, mostrando poca resolución en la topología para separar las cepas de la Reserva Ecológica Costanera Norte y aquellas de la Reserva Natural Punta Lara. Varios autores han obtenido resultados similares (Hyde et al. 2009; Crouch et al. 2009) señalando que en este género particularmente, la región ITS probablemente esté altamente conservada y que no posee los niveles de resolución necesarios para distinguir especies, solo siendo útil como una primera aproximación (Du et al. 2005; Cai et al. 2009; Gazis et al. 2011; Crouch et al. 2009).

Los análisis realizados en este trabajo basado con los genes Actina,  $\beta$ -Tubulina, GDPH y GS han evidenciado una importante definición mostrando agrupamientos claros y

mayormente congruentes entre sí, revelando que poblaciones de diferentes especies habitan en ambas reservas. El análisis con distintos genes, como los utilizados en este capítulo, han sido previamente utilizados obteniendo resultados similares (Hyde et al. 2009; Prihastuti et al. 2009; Weir et al. 2012). Debido a que distintas regiones o genes pueden resolver la filogenia dependiendo de las especies consideradas, una aproximación multigénica para reforzar las señales filogenéticas es recomendable para describir nuevas especies de *Colletotrichum* (Cannon et al. 2012). Los análisis llevados aquí adelante parecen señalar que en la Reserva Natural Punta Lara (sitio 1) la presencia mayoritaria de *C. boninense* y en menor frecuencia la presencia de *C. karstii*, particularmente las cepas 5P, 6P, mientras que en la Reserva Ecológica Ciudad Universitaria (sitio 2) los estudios indican como especie predominante *C. karstii*.

Adicionalmente a las especies *C. karstii* y *C. boninense*, en los análisis utilizando los genes de Actina,  $\beta$ -Tubulina y GDPH, dos cepas, la 8 y 9 aparecen agrupadas en un clado separado del resto de las especies, indicando que una tercera especie estaría presente en la Reserva Ecológica Costanera Norte relacionada a las encontradas y dentro de *C. boninense* complex. Solo los análisis con ITS y GS muestran diferencias respecto de la ubicación de las cepas 8 y 9, los cuales las ubican en medio de los clados correspondientes a *C. kartii* y *C. boninense*. Los estudios llevados adelante señalan que estas dos cepas constituirían una especie nueva para la ciencia no descripta previamente (ver consideraciones taxonómicas). Por otro lado la cepa P10 aislada de las poblaciones de *B. salicifolius* de la Reserva Nacional El Palmar (sitio adicional) parece corresponder a *C. karstii*, identificación soportada en todos los genes analizados a excepción del de Calmodulina, mientras que la ubicación de la secuencia de P19 en los árboles obtenidos no muestra congruencia ni entre los genes estudiados ni entre los métodos de análisis aplicados. Esta cepa particularmente (P19) obtuvo valores de Qc y Identidad cercanos al

99% con la cepa de referencia JQ247617 correspondiente a *C. karstii* para el gen GS, sin embargo en el análisis correspondiente no aparecen agrupado con esta cepa de referencia, mientras que en los genes GDPH y  $\beta$ -Tubulina se agrupa con *C. euphorbiae*, indicando que su asignación taxonómica a una especie dentro del género sería apresurada sin más estudios e indicando que Argentina albergaría varias especies no registradas de *Colletotrichum*.

En su conjunto los datos obtenidos parecen señalar que la composición de las comunidades respecto de las cepas asociadas al género *Colletotrichum* (quien representó el 11,7 % de las cepas obtenidas) difiere en las especies establecidas, con escasa superposición de los taxones. Esto indicaría que la influencia del Río de la Plata y Uruguay, en términos de su acción como corredor biológico, parece ser nula o pobre en el caso de las especies de *Colletotrichum*. Como hemos señalado existen pocos trabajos precedentes donde hayan sido evaluadas comunidades fúngicas influenciadas por corredores biológicos (Helander et al. 2007; Johnson y Haddad 2011). El trabajo de Helander et al. (2007) mostró que existía variación en los ensamblajes de endofitos a lo largo de las islas y que esta variación parecería responder a las corrientes de aire. Johnson y Haddad (2011) estudiando el efecto de corredores de vegetación y/o eólicos en la dispersión de patógenos, evidencian que el corredor parece tener poco o nula influencia en la dispersión de las esporas, e indicando a la temperatura como un factor que explica las diferencias encontradas. Ambos estudios se centran en distintos aspectos antes no considerados, y se acercan a los planteados en este estudio donde el corredor no parece mostrar influencia en el mantenimiento del flujo genético en distancias como las involucradas en este estudio. A diferencia de lo planteado por Johnson y Haddad (2011), el estudio aquí llevado a cabo no evalúa corredores de vegetación y/o eólicos

sino corredores fluviales, los cuales presentan una dinámica distinta, y plantean otro grado de complejidad en su evaluación.

En su conjunto los resultados obtenidos parecen indicar que en el ensamblaje de las comunidades endofíticas, al menos en lo que se refiere a sus especies más frecuentes, no estaría influenciado por el inóculo que se mueve vía el corredor biológico, al menos en distancia similares a las evaluadas en este estudio y que las variables determinantes para este ensamblaje, probablemente deban ser exploradas a escalas menores que las consideradas aquí. Sin embargo, cabe destacar que durante este estudio no se han evaluado las especies en cuanto a sus capacidades de dispersión en el corredor biológico. Es posible que los resultados aquí hallados no puedan generalizarse y que solo sean válidos para aquellas especies con características morfológicas semejantes en particular en cuanto a sus estructuras dispersivas (conidios, conidiomas, etc) a *Colletotrichum*. Así grupos de especies con características de dispersión diferentes a las presentadas por este género podrían presentar respuestas diferentes a las aquí encontradas.

## Discusión general

En su conjunto los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo nos han permitido caracterizar la diversidad fúngica asociada a *B. salicifolius* demostrando que las comunidades endofíticas foliares de árboles presentan una importante riqueza específica representando una fuente importante de recursos genéticos disponibles. Estos resultados resultan congruentes con los previamente obtenidos por otros autores (Arnold y Herre 2003a; Arnold et al. 2003b; Saikkonen et al. 2004; Rodriguez et al. 2009; Arnold y Lutzoni 2007a; Arnold 2007b; Huang et al. 2009; Porras-Alfaro y Bayman 2011; Lau et al. 2013).

Los resultados encontrados en primer lugar muestran comunidades disímiles en su composición. En la búsqueda de una explicación para las diferencias observadas se realizaron análisis incluyendo factores previamente evaluados, en otras comunidades endofíticas foliares, como factores ambientales y adicionalmente se incluyó la transformación del hábitat, una medida que previamente no había sido estudiada en relación a comunidades fúngicas. Los resultados obtenidos sugieren que ninguno de estos factores posee un efecto determinante sobre la comunidad. Resultados previos (Helander et al. 2007; Talley et al. 2002; Arnold 2007b; U'Ren et al. 2012) en otras comunidades endofíticas estudiadas dan cuenta de una importante controversia respecto de los resultados obtenidos y que hasta el momento no parece haber datos concluyentes que puedan ser generalizados.

Adicionalmente, y en la búsqueda de explorar características ambientales que pudieran determinar la composición de la comunidad endofítica foliar, como eje final de este

trabajo se exploró la influencia del corredor biológico fluvial asociado las poblaciones del hospedante, sobre la composición de la comunidad. Los resultados indicaron que esta característica del paisaje, al menos en las condiciones aquí estudiadas, tendría ninguna o poca influencia como determinantes de la composición de la comunidad endofítica foliar. Solo dos trabajos previos estudiaron la influencia del paisaje sobre las comunidades endofíticas foliares (Helander et al. 2007; Johnson y Haddad 2011) mostrando resultados similares a los aquí descritos.

En su conjunto los análisis llevados adelante señalarían que las comunidades endofíticas foliares estarían influenciadas por factores locales y que el inóculo disponible sería también de origen local.

## Conclusiones

- Se describe por primera vez la comunidad endofítica de la especie arbórea *Blepharocalyx salicifolius* en poblaciones Argentinas,
- La misma especie hospedante en poblaciones diferentes, alberga comunidades que varían tanto en su diversidad como en su estructura, pudiendo presentar especies dominantes diferentes.
- Los factores ambientales, el tipo de hospedante y el grado de transformación del hábitat tienen poca influencia como determinantes en la composición de la comunidad endofítica foliar de árboles
- La dispersión del inóculo de, al menos algunas de las especies endofíticas foliares de árboles, no estaría influenciada por la cercanía a corredores biológicos representados por cursos de agua, al menos en las distancias aquí evaluadas.
- Se propone una especie nueva para la ciencia dentro del género *Colletotrichum*.
- La presencia de nuevos registros y posibles nuevas especies encontradas en este trabajo, marcan la necesidad de continuar con un número de estudios de diversidad aún más completos.

En la presente tesis se ha producido información muy valiosa sobre las comunidades de endofitos foliares en un hospedante arbóreo nativo, que promueven a seguir estudiando estos microorganismos y genera nuevas preguntas a ser respondidas. Por otro lado el



desconocimiento al día de la fecha sobre las especies fúngicas endofíticas y la composición de estas comunidades en la vegetación de Argentina, se acentúan la falta de entendimiento de la diversidad de los organismos que albergan las especies vegetales de nuestro país y la importancia de conocer uno de los bienes más valiosos que tenemos a futuro. Por lo tanto este trabajo humildemente intenta contribuir a esta necesidad imperiosa de conocimiento sobre nuestro legado.

# *Bibliografía*

---

- Allegrucci N, Cabello MN, Arambarri AM (2009) DIVERSITY OF SAPROTROPHIC ANAMORPHIC ASCOMYCETES. *Darwiniana*, nueva serie 47 (1):108-124
- Arnold A, Deshmukh S, Rai M (2005) Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. *Biodiversity of fungi: their role in human life*:49-68
- Arnold A, Maynard Z, Gilbert G, Coley P, Kursar T (2000) Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology letters* 3 (4):267-274
- Arnold AE (2007b) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21 (2-3):51-66. doi:10.1016/j.fbr.2007.05.003
- Arnold AE (2008) Hidden within our botanical richness, a treasure trove of fungal endophytes. *The Plant Press* 32: 13-15
- Arnold AE, Henk DA, Eells RL, Lutzoni F, Vilgalys R (2007) Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99 (2):185-206
- Arnold AE, Herre EA (2003a) Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95 (3):388-398
- Arnold AE, Lutzoni F (2007a) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88 (3):541-549
- Arnold AE, Mejia LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003b) 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. doi:10.1073/pnas.2533483100
- Aschehoug ET, Metlen KL, Callaway RM, Newcombe G (2012) Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology* 93 (1):3-8
- Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D, Langebartels C, Nunn AJ, Rothenburger J, Schubert R, Wallis P, Müller-Starck G, Werner H, Matyssek R, Sandermann Jr H (2005) Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonia errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biol (Stuttg)* 7 (6):659-669. doi:10.1055/s-2005-872943
- Bálint M, Tiffin P, Hallström B, O'Hara RB, Olson MS, Fankhauser JD, Piepenbring M, Schmitt I (2013) Host genotype shapes the foliar fungal microbiome of balsam poplar (*Populus balsamifera*). *PloS one* 8 (1):e53987
- Barbaruah B, Chutia M, Boruah P (2012) Soil hyphomycetes population dynamics in disturbed and undisturbed tropical soils of North-eastern India. *African Journal of Microbiology Research* 6 (25):5344-5352
- Barneche S, Bertucci A, Haretche F, Olivaro C, Cerdeiras MP, Vázquez A (2010) Prospección química y microbiológica del bosque de galería del Río Uruguay. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20 (6):878-885. doi:10.1590/s0102-695x2010005000044
- Barragán F, Moreno CE, Escobar F, Halffter G, Navarrete D (2011) Negative impacts of human land use on dung beetle functional diversity. *PloS one* 6 (3):e17976
- Basso L, Pouso J (1992) Relevamiento y descripción de la flora arbórea y arborescente de la Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres. Trabajo Final, Universidad de la República, Facultad de Agronomía 2
- Bettucci L, Simeto S, Alonso R, Lupo S (2004) Endophytic fungi of twigs and leave from three native species of Myrtaceae in Uruguay. *SYDOWIA-HORN-* 56:8-23
- Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany* 98 (3):426-438
- Boer Wd, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development\*. *FEMS microbiology reviews* 29 (4):795-811
- Botella L, Santamaría O, Díez JJ (2010) Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity* 40 (1):1-11. doi:10.1007/s13225-010-0025-5
- Byrd KB, Parker VT, Vogler DR, Cullings KW (2000) The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungus diversity in a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand,

- Yellowstone National Park, Wyoming, and Gallatin National Forest, Montana. *Canadian Journal of Botany* 78 (2):149-156
- Cabral D (1985) Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*: Dynamics of fungal populations. *Transactions of the British Mycological Society* 85 (3):501-511
- Cabrera AL (1971) Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14:1-42
- Cabrera AL (1976) Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II. Fascículo 1. Regiones Fitogeográficas Argentinas. ACME, Buenos Aires Fascículo 1 (Tomo 2. 2ª edición. Acme.):pp. 1-85.
- Cabrera AL (1994) Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II. Fascículo 1. Regiones Fitogeográficas Argentinas. ACME, Buenos Aires
- Cai L, Hyde K, Taylor P, Weir B, Waller J, Abang M, Zhang J, Yang Y, Phoulivong S, Liu Z (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39 (1):183-204
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in mycology* 73 (1):181-213. doi:10.3114/sim0014
- Carroll GC, Carroll FE (1978) Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany* 56 (24):3034-3043
- Clay K, Holah J (1999) Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285 (5434):1742-1744
- Conrad AKJ (1831) Die Pilze Deutschlands. . In: Sturm J, ed, Deutschlands Flora 3 Abtheilung 3(12):33-64
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009) What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101 (5):648-656
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JH, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG, Crous PW (2012) The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in mycology* 73 (1):1-36. doi:10.3114/sim0002
- de Errasti A NM, Carmarán CC. (En prensa) Plant-fungal association in trees: insights into changes in ecological strategies of *Peroneutypa scoparia* (Diatrypaceae). . *Flora*
- De Fina AL (1992) Aptitud agroclimática de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria Buenos Aires,
- Du M, Schardl CL, Nuckles EM, Vaillancourt LJ (2005) Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97 (3):641-658
- Durán EL, Ploper LD, Ramallo JC, Piccolo 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
- Errasti A, Carmarán CC, Novas MV (2010) Errasti et al, Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity* 41 (1):29-40. doi:10.1007/s13225-009-0012-x
- Espinosa-García F, Langenheim J (1990) The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population diversity and spatial patterns. *New Phytologist* 116 (1):89-97
- Faeth SH, Gardner DR, Hayes CJ, Jani A, Wittlinger SK, Jones TA (2006) Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of chemical ecology* 32 (2):307-324
- Faeth SH, Hammon KE (1997) Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology* 78 (3):810-819
- Faeth SH, Saari S (2012) Fungal grass endophytes and arthropod communities: lessons from plant defence theory and multitrophic interactions. *Fungal Ecology* 5 (3):364-371
- Fischer J, Lindenmayer DB (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* 16 (3):265-280

- Fisher P, Petrini O, Petrini L, Sutton B (1994) Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist* 127 (1):133-137
- Fröhlich J, Hyde KD (1999) Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity & Conservation* 8 (7):977-1004
- Gamboa Gaitan M (2006) Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta biol colomb* 11 (supl. 1):3-20
- Gamboa MA, Bayman P (2001) Communities of Endophytic Fungi in Leaves of a Tropical Timber Tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae) I. *Biotropica* 33 (2):352-360
- Gamboa MA, Laureano S, Bayman P (2002) Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia* 156 (1):41-45
- Garneau F-X, Collin GJ, Jean F-I, Gagnon H, Arze JBL (2013) Essential oils from Bolivia. XIII. Myrtaceae: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. *Journal of Essential Oil Research* 25 (3):166-170
- Gaylord ES, Preszler RW, Boecklen WJ (1996) Interactions between host plants, endophytic fungi, and a phytophagous insect in an oak (*Quercus grisea* x *Q. gambelii*) hybrid zone. *Oecologia* 105 (3):336-342
- Gazis R, Rehner S, Chaverri P (2011) Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology* 20 (14):3001-3013
- Giudice GE, Ramos Giacosa JP, Luján Luna M, Yañez A, de la Sota ER (2011) Diversidad de helechos y licófitas de la Reserva Natural Punta Lara, Buenos Aires, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 59 (3):1037-1046
- 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
- Goh T-K, Hyde KD (1998) *Polybulbophiale palmicola* gen. et sp. nov. (Hyphomycetes) from Brunei. *Mycotaxon* 69:145-151
- Griffith G, Boddy L (1990) Fungal decomposition of attached angiosperm twigs I. Decay community development in ash, beech and oak. *New Phytologist* 116 (3):407-415
- Guerber JC, Liu B, Correll JC, Johnston PR (2003) Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95 (5):872-895
- Gundel PE, Maseda PH, Ghersa CM, Benech-Arnold RL (2006) Effects of the *Neotyphodium* endophyte fungus on dormancy and germination rate of *Lolium multiflorum* seeds. *Austral Ecology* 31 (6):767-775. doi:10.1111/j.1442-9993.2006.01638.x
- Guo LD, Huang GR, 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
- Hartnett DC, Wilson GW (1999) Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology* 80 (4):1187-1195
- Hawksworth DL (2004) Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in mycology* 50:9-18
- Helander M, Ahlholm J, Sieber TN, Hinneri S, Saikonen K (2007) Fragmented environment affects birch leaf endophytes. *The New phytologist* 175 (3):547-553. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02110.x
- Helander M, Neuvonen S, Sieber T, Petrini O (1993) Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. *Microbial ecology* 26 (3):227-234
- Herre EA, Mejía LC, Kyllö DA, Rojas E, Maynard Z, Butler A, Van Bael SA (2007) Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* 88 (3):550-558
- Hoyos LE, Gavier-Pizarro GI, Kuemmerle T, Bucher EH, Radeloff VC, Tecco PA (2010) Invasion of glossy privet (*Ligustrum lucidum*) and native forest loss in the Sierras Chicas of Córdoba, Argentina. *Biological invasions* 12 (9):3261-3275

- Huang F, Chen G, Hou X, Fu Y, Cai L, Hyde K, Li H (2013) *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity* 61 (1):61-74
- Huang W, Cai Y, Surveswaran S, Hyde K, Corke H, Sun M (2009) Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity* 36:69
- Hyde K, Cai L, McKenzie E, Yang Y, Zhang J, Prihastuti H (2009) *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39:1
- Hyde K, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33:163-173
- Iannone LJ, Novas MV, Young CA, De Battista JP, Schardl CL (2012) Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. *Fungal Ecology* 5 (3):357-363. doi:10.1016/j.funeco.2011.05.007
- Iannone LJ, White Jr JF, Giussani LM, Cabral D, Novas MV (2011) Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological progress* 10 (1):9-19
- Johnson BL, Haddad NM (2011) Edge effects, not connectivity, determine the incidence and development of a foliar fungal plant disease. *Ecology* 92 (8):1551-1558
- Johnston PR, Jones D (1997) Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*:420-430
- Jumpponen A, Trappe JM (1998) Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140 (2):295-310
- Kremen C (2005) Managing ecosystem services: what do we need to know about their ecology? *Ecology letters* 8 (5):468-479. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00751.x
- Larran S, Bahima JV, Bello G (2011) First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on *Blepharocalyx salicifolius* in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes* 6 (1):18-19. doi:10.1007/s13314-011-0006-x
- Larran S, Perello A, Simon M, Moreno V (2002) Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (7):683-686
- Latrubesse EM (2008) Patterns of anabranching channels: The ultimate end-member adjustment of mega rivers. *Geomorphology* 101 (1):130-145
- Lau MK, Arnold AE, Johnson NC (2013) Factors influencing communities of foliar fungal endophytes in riparian woody plants. *Fungal Ecology* 6 (5):365-378
- Lee KK, Gloer JB, Scott JA, Malloch D (1995) Petriellin A: A novel antifungal depsipeptide from the coprophilous fungus *Petriella sordida*. *The Journal of Organic Chemistry* 60 (17):5384-5385
- Lee S, Hanlin RT (1999) Phylogenetic relationships of *Chaetomium* and similar genera based on ribosomal DNA sequences. *Mycologia*:434-442
- Liebecq C (1992) *Biochemical Nomenclature: And Related Documents: A Compendium* (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Chapel Hill, NC. Portland Press,
- Limberger R, Sobral M, Zuanazzi J, Moreno P, Schapoval E, Henriques A (2001) Biological activities and essential oil composition of leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. *Pharmaceutical biology* 39 (4):308-311
- Lindborg R, Eriksson O (2004) Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. *Ecology* 85 (7):1840-1845
- Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Fraser K, Ryan GD, Newman JA, Rasmussen S (2011) Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus* spp. fungi in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. *Functional Ecology* 25 (4):910-920
- Lorenzi H (1992) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p-col illus Por Geog 4
- Lu G, Cannon PF, Reid A, Simmons CM (2004) Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research* 108 (1):53-63. doi:10.1017/s0953756203008906

- Maharachchikumbura SSN, Guo L-D, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2011) *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity* 50 (1):167-187. doi:10.1007/s13225-011-0125-x
- Mahesh B, Tejasvi M, Nalini M, Prakash H, Kini KR, Subbiah V, Shetty HS (2005) Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Current Science* 88 (2):218-219
- Maheswari S, Rajagopal K (2011) Biodiversity of endophytic fungi associated with *Ficus religiosa* and *F. benghalensis*. *Mycol. Balcanica* 8:169-172
- Marinho AM, Rodrigues-Filho E, Moitinho MdLR, Santos LS (2005) Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16 (2):280-283
- McCutcheon TL, Carroll GC (1993) Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas fir. *Mycologia*:180-186
- Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Bael SV, Arnold AE, Hebbar P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46 (1):4-14
- Moriwaki J, Sato T, Tsukiboshi T (2003) Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience* 44 (1):47-53. doi:10.1007/s10267-002-0079-7
- 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. doi:10.1139/w06-020
- Nath A, Raghunatha P, Joshi S (2012) Diversity and biological activities of endophytic fungi of *Embllica officinalis*, an ethnomedicinal plant of India. *mycobiology* 40 (1):8-13
- Neiff J, DE NEIFF A, Casco S (2005) Importancia ecológica del corredor fluvial Paraguay-Paraná como contexto del manejo sostenible. *Contribución de los proyectos PICT* 12755
- Neiff JJ, Arturi M, Frangi J, Goya J (2004) Bosques fluviales de la cuenca del Paraná. *Ecología y manejo de los bosques de Argentina La Plata, Argentina*
- Novas M, Cabral D, Godeas A (2005) Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis* 40 (1):23-30
- 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 - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 203 (7):610-616. doi:10.1016/j.flora.2007.09.010
- 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
- Novas MV, Gentile A, Cabral D (2003) Comparative study of growth parameters on diaspores and seedlings between populations of *Bromus setifolius* from Patagonia, differing in *Neotyphodium* endophyte infection. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 198 (6):421-426
- Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM, Cabral D (2009) Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological progress* 8 (1):75-81
- Oldani NO (1990) Variaciones de la abundancia de peces del valle del río Paraná (Argentina). *Rev Hydrobiol Trop* 23 (1):67-76
- Orth AB, Royse D, Tien M (1993) Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied and environmental microbiology* 59 (12):4017-4023
- Panaccione DG, Johnson RD, Wang J, Young CA, Damrongkool P, Scott B, Schardl CL (2001) Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22):12820-12825

- Peres N, MacKenzie S, Peever T, Timmer L (2008) Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98 (3):345-352
- Pérez C, Altier N, Simeto S, Wingfield M, Slippers B, Blanchette R (2008) Botryosphaeriaceae aisladas de Eucalyptus y Mirtáceas nativas en Uruguay. *Agrociencia* 12 (2):19-30
- Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA (2010) Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41 (1):53-69. doi:10.1007/s13225-009-0014-8
- Petrini O (1986) Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. *Microbiology of the phyllosphere*/edited by NJ Fokkema and J van den Heuvel
- Petrini O, Carroll G (1981) Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany* 59 (5):629-636
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O (1993) Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins* 1 (3):185-196
- Photita W, Taylor PW, Ford R, Hyde KD, Lumyong S (2005) Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18:117-133
- Porras-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Phytopathology* 49 (1):291
- Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie E, Hyde K (2009) Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39:89
- Roberts CA, Davis DK, Looper ML, Kallenbach RL, Rottinghaus GE, Hill NS (2014) Ergot Alkaloid Concentrations in High-and Low-Moisture Tall Fescue Silage. *Crop Science*
- Robles CA (2014) 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 1:276
- Rocha AC, García D, Uetanabaro AP, Carneiro RT, Araújo IS, Mattos CR, Góes-Neto A (2011) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47 (1):75-84
- Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y-O, Redman RS (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME journal* 2 (4):404-416
- Rodriguez RJ, White JF, Jr., Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New phytologist* 182 (2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Rojas EI, Rehner SA, Samuels GJ, Van Bael SA, Herre EA, Cannon P, Chen R, Pang J, Wang R, Zhang Y (2010) *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102 (6):1318-1338
- Rojas LA, Chavarría MI (2013) Corredores biológicos de Costa Rica.
- Rollinger JL, Langenheim JH (1993) Geographic survey of fungal endophyte community composition in leaves of coastal redwood. *Mycologia*:149-156
- Rosales J, Leal S Corredor Ribereño del Orinoco y sus atributos: valoración de un potencial natural para ecoturismo fluvial. In: *Proceedings de la Conferencia de Expoecoturismo*, 2003.
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in plant science* 9 (6):275-280
- Schmidt O (2006) *Wood and tree fungi*. Springer,
- Seifert KA, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B (2011) *The genera of Hyphomycetes*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht,
- Sieber TN (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21 (2):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):90-106
- Statistica (2004 ) STATISTICA (data analysis software system), version 7. StatSoft, Inc. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stefanello MEA, Pascoal AC, Salvador MJ (2011) Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & biodiversity* 8 (1):73-94
- Stringari D, Glienke C, Christo Dd, Maccheroni Jr W, Azevedo JLd (2009) High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (5):1063-1073
- Sun X, Ding Q, Hyde KD, Guo LD (2012) <2012 Sun et al. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest..pdf>. *Fungal Ecology* 5 (5):624-632. doi:10.1016/j.funeco.2012.04.001
- Sun X, Guo L-D, Hyde K (2011) Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity* 47 (1):85-95
- Suryanarayanan TS, Murali TS, Thirunavukkarasu N, Govinda Rajulu MB, Venkatesan G, Sukumar R (2011) Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodiversity and Conservation* 20 (5):913-928. doi:10.1007/s10531-011-0004-5
- Talley SM, Coley PD, Kursar TA (2002) The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC ecology* 2 (1):7
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30 (12):2725-2729
- Thongsandee W, Matsuda Y, Ito S (2012) Temporal variations in endophytic fungal assemblages of *Ginkgo biloba* L. *Journal of forest research* 17 (2):213-218
- Torres MS, White JF, Zhang X, Hinton DM, Bacon CW (2012) Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. *Fungal Ecology* 5 (3):322-330. doi:10.1016/j.funeco.2011.05.006
- Tylianakis JM, Tscharntke T, Lewis OT (2007) Habitat modification alters the structure of tropical host-parasitoid food webs. *Nature* 445 (7124):202-205
- U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD, Arnold AE (2012) Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American journal of botany* 99 (5):898-914. doi:10.3732/ajb.1100459
- Udayanga D, Liu X, McKenzie EH, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2011) The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity* 50 (1):189-225
- Unterseher M (2011) Diversity of fungal endophytes in temperate forest trees. In: *Endophytes of forest trees*. Springer, pp 31-46
- van der Aa HA, Vanev SG, Aptroot A, Summerbell RC, Verkley GJ (2002) A revision of the species described in *Phyllosticta*. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht,
- van der Heijden MG, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79 (6):2082-2091
- Vaz A, da Costa AG, Raad LV, Góes-Neto A (2013) Fungal endophytes associated with three South American Myrtaceae (< i> Myrtaceae</i>) exhibit preferences in the colonization at leaf level. *Fungal Biology*
- Vaz A, Fontenla S, Rocha FS, Brandão LR, Vieira ML, de Garcia V, Góes-Neto A, Rosa CA (2014) Fungal endophyte  $\beta$ -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal Ecology* 8:28-36
- Vieira WA, Michereff SJ, de Moraes Jr MA, Hyde KD, Câmara MP (2014) Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*:1-22
- Weber D, Gorzalczany S, Martino V, Acevedo C, Sterner O, Anke T (2005) Metabolites from endophytes of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *Z Naturforsch* 60c:467-477
- Weir BS, Johnston PR, Damm U (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology* 73 (1):115-180. doi:10.3114/sim0011

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322
- Wikee S, Udayanga D, Crous PW, Chukeatirote E, McKenzie EH, Bahkali AH, Dai D, Hyde KD (2011) *Phyllosticta*—an overview of current status of species recognition. *Fungal Diversity* 51 (1):43-61
- Wilson D (1995) Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*:274-276
- Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, Meevootisom V (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20 (3):265-272